

Aerob-thermophile Reinigung mineralölkontaminierter Abwässer

dem Promotionsausschuss der Fakultät für Biologie, Chemie und
Geowissenschaften vorgelegte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

von

Alexandra M. C. Oberthür

aus München

2004

Vollständiger Abdruck der vom Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften.

Tag der Einreichung der Arbeit: 01.09.2004

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 28.04.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Peiffer

2. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Freitag

"There is no doubt about our absolute and complete dependence on oil. We have passed from the Stone Age, to Bronze, to Iron, to the Industrial Age, and now to an 'age of oil'. Without oil, [...] civilization as we know it could not exist."

Harold Ickes, US-Innenminister unter Franklin D. Roosevelt, 1933

If the people [...] are dehumanized and their ecology destroyed, it does not matter to them [i.e. managers of the oil company]. If they can hide this human and ecological wastage from prying public eyes, that is a measure of success.

Oil is about money. Oil is money.

Ken Saro-Wiwa[†], Nigerianischer Literat und Bürgerrechtler, 1991

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN	VI
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VII
ZUSAMMENFASSUNG.....	X
SUMMARY	XII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Mineralölkontaminierte Abwässer	1
1.2 Stand der Forschung	2
1.3 Die thermophile aerobe Verfahrensführung.....	4
1.4 Ziele der Arbeit.....	5
2 MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1 Mikrobiologische Techniken	7
2.1.1 Der Mikroorganismus.....	7
2.1.2 Das Kulturmedium	8
2.1.3 Vorkulturen - Stammhaltung	10
2.1.4 Durchführung der Experimente	11
2.1.4.1 Experimente in Inkubationskolben.....	11
2.1.4.2 Reaktorversuche im autoklavierbaren Laborfermenter	12
2.1.4.3 Die Pilotanlage	15
2.2 Einzelsubstanzen.....	16
2.2.1 Repräsentative Mineralölkohlenwasserstoffe.....	16
2.2.2 Auswahl der Zusatzstoffe	17
2.2.2.1 Tenside	18
2.2.2.2 Ethylendiamintetraacetat	20
2.2.2.3 Antimon und Zink	20

2.2.2.4	Kommerzielle Zusatzstoffe.....	21
2.3	Kühlschmierstoffe	21
2.3.1	Standardmischung KSS A.....	22
2.3.2	Teilströme der Automobilproduktion	22
2.3.2.1	Kühlschmierstoffe.....	23
2.3.2.2	Spüllösung zum Reinigen der Lackleitungen	23
2.4	Prozessüberwachung	24
2.4.1	Messung der optischen Dichte	24
2.4.2	Gesamtzelldichte.....	25
2.4.3	Bestimmung der Lipaseaktivität mit p-Nitrophenyllaurat	25
2.4.4	Bestimmung der Tenside	27
2.4.4.1	Anionische Tenside: Lösungsmittlextraktion mit Ethylviolett	27
2.4.4.2	Nichtionische Tenside: Lösungsmittlextraktion mit Kaliumpikrat.....	28
2.5	Prozesscharakterisierung und Analytik	29
2.5.1	Aufarbeitung der Proben.....	29
2.5.1.1	Fließschema der Aufarbeitungsschritte	29
2.5.1.2	Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs	30
2.5.1.3	Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs.....	31
2.5.2	Gaschromatographische Untersuchungen.....	31
2.5.2.1	Konfiguration des GC-FID-Systems	31
2.5.2.2	GC-FID für Kühlschmierstoffe.....	32
2.5.2.3	Messung von 2-Butoxyethanol	32
2.5.3	Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration	33
2.5.3.1	Anionische Tenside: Leitfähigkeitsmessung	33
2.5.3.2	Nichtionische Tenside: Oberflächenspannungsmessung	34
2.5.4	Bestimmung der Metallgehalte der Abwässer aus der Kfz-Produktion.....	35
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	36
3.1	Verwertbarkeit des MKW-Standardsubstrats.....	36
3.2	Kultivierung unter dem Einfluss von Tensiden	40
3.2.1	Ergebnisse der CMC-Bestimmung	40
3.2.2	Einfluss von SDS	43

3.2.3	Einfluss von SDBS	46
3.2.4	Einfluss von Tergitol® NPX	49
3.2.5	Einfluss von Triton X-100	51
3.2.6	Einfluss der Metalle und kommerziellen Zusatzstoffe	54
3.3	Verwertbarkeit des Kühlschmierstoffs KSS A	56
3.3.1	Einzelkomponenten von KSS A	56
3.3.2	Verwertbarkeit von KSS A	59
3.4	Verwertbarkeit von Abwässern aus der Kfz-Produktion.....	62
3.4.1	Ergebnisse der Abwassercharakterisierung	62
3.4.2	Aluminiumbearbeitung	67
3.4.3	Laugenmischemulsion	70
3.4.4	Graugussbearbeitung	74
3.4.5	Spüllösung aus der Lackiererei und 2-Butoxyethanol.....	75
3.5	Experimente in der Pilotanlage	79
3.6	Vergleich der Wachstumsraten	81
3.7	Diskriminanzanalyse	84
4	SYNTHESE UND AUSBLICK	89
4.1	Synthese	89
4.2	Ausblick	92
5	LITERATURVERZEICHNIS	94
6	ANHANG	105
6.1	Abbildungen	105
6.2	Tabellen	106
DANKSAGUNG		110
ERKLÄRUNG		111

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 2-1: Aufbau des Laborfermenters	13
Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau des Laborfermenters in kontinuierlicher Betriebsweise	15
Abbildung 2-3: Fließschema der aeroben Pilotanlage	16
Abbildung 2-4: Reaktion von p-Nitrophenyllaurat zu p-Nitrophenol	26
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung	30
Abbildung 3-1: Ergebnisse der Inkubationskolbenversuche mit ausgewählten MKW	36
Abbildung 3-2: Batchexperiment zur Verwertbarkeit des synthetischen Abwassers als Kohlenstoffquelle	37
Abbildung 3-3: Ermittlung der OUR	39
Abbildung 3-4: Bestimmung der CMC von SDS über die Leitfähigkeit	42
Abbildung 3-5: Einfluss der Zugabe von SDS	44
Abbildung 3-6: Einfluss der Zugabe von SDBS (1)	46
Abbildung 3-7: Einfluss der Zugabe von SDBS (2)	48
Abbildung 3-8: Einfluss der Zugabe von Tergitol® NPX	49
Abbildung 3-9: Einfluss der Zugabe von Triton X-100	51
Abbildung 3-10: Einfluss der Zugabe des Shampoos „Polin“	54
Abbildung 3-11: Batchexperiment zur Verwertbarkeit der KSS-Komponente OLD	57
Abbildung 3-12: Semikontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit von auf 1 ‰ ver- dünntem KSS A	59
Abbildung 3-13: Variation der Zulaufkonzentration	61
Abbildung 3-14: GC-Chromatogramm der Kühlschmieremulsion zur Aluminiumbearbeitung	64
Abbildung 3-15: Bestimmung des Zetapotentials der ungefällten und der mit Fe(II)SO_4 gefällten Spüllösung	66
Abbildung 3-16: Batchexperiment zur Verwertbarkeit von KSS aus der Aluminium- bearbeitung	67
Abbildung 3-17: Semikontinuierliches Experiment mit KSS aus der Aluminiumbearbeitung zur Ermittlung der DOC-Eliminierung	68

Abbildung 3-18: Kontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit der Laugenmischemulsion bei Verwendung des Filtrationselements zur Zellrückhaltung.....	70
Abbildung 3-19: Verläufe des CSB für das in Abbildung 3-18 dargestellte kontinuierliche Experiment und ein Wiederholungsexperiment	72
Abbildung 3-20: Semikontinuierliches Experiment unter Zufuhr des KSS zur Graugussbearbeitung	74
Abbildung 3-21: Batchexperiment zur Verwertbarkeit ungefällter Spüllösung.....	76
Abbildung 3-22: Semikontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit von 2-Butoxyethanol	76
Abbildung 3-23: Indirekter Nachweis der Metabolisierung von 2-Butoxyethanol.....	78
Abbildung 3-24: Kontinuierliches Experiment mit KSS A, durchgeführt in der mobilen Pilotanlage	79
Abbildung 3-25: Auftragung der maximalen Wachstumsraten μ_{\max}	83
Abbildung 3-26: Territorialdarstellung der Trenngeraden zwischen den Gruppen und Gruppenzentroide	86
Abbildung 3-27: Darstellung der Gruppenzentroide und verarbeiteten Fälle innerhalb des durch die kanonischen Diskriminanzfunktionen aufgespannten Koordinatensystems. ...	87
Abbildung 6-1: Ermittlung der OUR.....	105
Abbildung 6-2: Energiebilanz pro m^3 Abwasser als Funktion der CSB-Elimination für die Reinigung fettbelasteter Abwässer in der mobilen Pilotanlage.....	105

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 2-1: Zusammensetzung eines synthetischen mineralölkontaminierten Abwassers in Anlehnung an Dieselöle	17
Tabelle 2-2: Zusammensetzung von Abwässern aus Fahrzeugreinigungsanlagen.....	18
Tabelle 2-3: Ausgewählte Tenside und deren Einsatzgebiet	19
Tabelle 2-4: Anwendungsbereich und Zusammensetzung der Kühlschmierstoffe aus der Kfz-Produktion.....	23
Tabelle 2-5: Technische Daten des verwendeten GC-FID-Systems.....	31
Tabelle 3-1: Eingesetzte Tenside und deren experimentell ermittelte CMC	41
Tabelle 3-2: Abbausequenz ausgewählter Bestandteile der KSS A	60
Tabelle 3-3: Ergebnisse der Charakterisierung der KSS aus der Kfz-Produktion.....	63
Tabelle 3-4: Ergebnisse des Screenings auf Metallgehalte in den Audi-Abwässern.....	65
Tabelle 3-5: Maximal erzielte Wachstumsraten auf verschiedenen Substraten	82
Tabelle 3-6: Prädiktoren, Koeffizienten und Kenngrößen der berechneten Diskriminanzfunktionen	86
Tabelle 6-1: Technische Angaben zu den Filtermodulen der Pilotanlage	106
Tabelle 6-2: Zusammensetzung von Reinigungsmitteln für Kraftfahrzeuge.....	106
Tabelle 6-3: Struktur- und Summenformeln ausgewählter Tenside	107
Tabelle 6-4: Zusammensetzung Kühlschmierstoff KSS A der Firma Henkel.....	108
Tabelle 6-5: Prädiktoren der Diskriminanzanalyse.....	109

Verzeichnis der Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Einheit</i>	<i>Bedeutung</i>
'	0,254 m	Fuß
a		Jahr/e (lat. annum)
ALF		Autoklavierbarer Laborfermenter
BE		2-Butoxyethanol
ber.		Berechnet
BSB	mg·L ⁻¹	Biologischer Sauerstoffbedarf
BW		Blindwert
c(<i>i</i>)	mg·L ⁻¹	Konzentration der Substanz <i>i</i>
CMC		Kritische Mizellenbildungskonzentration (engl. Critical Micelle Concentration)
CSB	mg·L ⁻¹	Chemischer Sauerstoffbedarf
Δ		Differenz
d		Tag/e (engl. day)
DIN		Deutsche Industrienorm
DOC	mg·L ⁻¹	Gelöster organischer Kohlenstoff (engl. Dissolved Organic Carbon)
DSMZ		Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA		Ethylendiamintetraacetat
EN		Europäische Norm
Ext.		Extinktion
F	N	Federkraft
FA		Fettalkohol(alkoxylat)
Fa.		Firma
FID		Flammenionisationsdetektor
FS		Fettsäure

<i>Abkürzung</i>	<i>Einheit</i>	<i>Bedeutung</i>
GC		Gaschromatograph
g.		Gemessen
Gew.-%		Gewichtsprozent
h		Stunde/n (lat. hora)
Hz	s ⁻¹	Hertz
ISO		International Organization for Standardization
Kfz		Kraftfahrzeug/e
KSS		Kühlschmierstoff/e
μ	h ⁻¹	Wachstumsrate
$\bar{\mu}$		Mittelwert
max.		Maximal
min		Minute
MKW		Mineralölkohlenwasserstoff/e
mRNA		Messenger-RNA
OD _{610nm}		Optische Dichte, bestimmt bei 610 nm
OLD		Ölsäurederivat
OUR	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Sauerstoffaufnahme rate (engl. Oxygen Uptake Rate)
L		Liter
LAS		Lineare Alkylbenzolsulfonate
PAK		Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PE		Polyethylen
PCP		Pentachlorphenol
pNPL		p-Nitrophenyllaurat
p(O ₂)		Sauerstoffpartialdruck
ppm	mg·L ⁻¹	Konzentration (engl. parts per million)
Q	m ³ ·h ⁻¹	Zufluss
r _{DOC}	mg·h ⁻¹	DOC-Eliminierungsrate
r _{Abb.}	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Abbaurrate

<i>Abkürzung</i>	<i>Einheit</i>	<i>Bedeutung</i>
σ		Standardabweichung
σ_0	$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$	Oberflächenspannung
SDS		Natriumlaurylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SDBS		Natriumlaurylbenzolsulfonat (engl. Sodium Dodecyl Benzyl Sulfonate)
θ	h	Verweildauer, hydraulische Retentionszeit
T	$^{\circ}\text{C}$	Temperatur
t	h	Zeit
th.		Theoretisch
u	m	Umfang
UCM		Kohlenwasserstoff-Isomerengemisch (engl. Unresolved Complex Mixture)
Upm		Umdrehungen pro Minute
V	L	Volumen
v:v		Konzentration (engl. volume per volume)
vvm	$\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$	Belüftungsintensität (engl. volume per volume)
w:v		Konzentration (engl. weight per volume)
x		Prüfgröße
ZA		Zentrale Analytik

Zusammenfassung

Unter aeroben Bedingungen ist der thermophile Mikroorganismus *Geobacillus thermoleovorans* im Labor- und Pilotmaßstab fähig, verschiedene mit Mineralölen kontaminierte Abwässer als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Die Verwertbarkeit eines synthetischen Dieselöls sowie eines Kühlschmierstoffs standardisierter Zusammensetzung durch die Kultur wurde untersucht. Des Weiteren wurden Kühlschmieremulsionen aus Kfz-Produktionsstätten und Spüllösungen zum Reinigen von Lackleitungen auf deren biologische Abbaubarkeit hin geprüft. Der Nachweis von Metaboliten erfolgte an einem GC-FID-System (Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor). Im Vergleich zum Standardsubstrat Olivenöl wurden ähnliche, in Einzelfällen sogar höhere Wachstumsraten und Zelldichten erzielt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass die Initialisierung der Lipaseexpression durch Triglyceride Voraussetzung für den effizienten Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW) durch *Geobacillus thermoleovorans* ist.

Da MKW in der Praxis nahezu ausschließlich in Verbindung mit einer Vielzahl von Additiven gebraucht werden, wurde der Einfluss verschiedener Zusatzstoffe auf die Mikroorganismen erforscht. Als Kohlenstoffquelle diente das synthetische Dieselöl, als Zusatzstoffe wurden insbesondere Tenside, Flockungsmittel, Komplexbildner und Entschäumer verwendet.

Es zeigte sich, dass alle eingesetzten anionischen Tenside (Natriumlaurylsulfat = SDS, Natriumlaurylbenzolsulfonat = SDBS) und nichtionischen Tenside (Tergitol NPX[®], Triton X-100) in Konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC, engl. Critical Micelle Concentration) nachweislich das Wachstum der Kultur durch die Verbesserung der Substrat-Bioverfügbarkeit stimulieren. Oberhalb der CMC fördern anionische Tenside das Wachstum der Kultur; nichtionische Tenside wirken mit ansteigender Konzentration zunehmend inhibierend. Triton X-100 unterdrückt in Konzentrationen oberhalb der CMC die extrazelluläre Lipaseaktivität vollständig.

Positive und negative Effekte auf das Wachstumsverhalten der Kultur sind gleichermaßen das Resultat von Tensid-Membran-Interaktionen. Durch Einlagerung in die Zellmembranen erhöhen die Tenside die Permeabilität der Membranen für Enzyme, was wiederum zu einer Beschleunigung des MKW-Abbaus führt. Der inhibierende Einfluss von Triton X-100 hingegen kann auf die Konformation des Tensids zurückgeführt werden, die entweder die Ausscheidung von Enzymen behindert oder Zellmembran oder Enzyme direkt schädigt.

Die experimentell ermittelten CMC im aerob-thermophilen System betrugen $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ für SDS und SDBS, $90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ für Tergitol NPX[®] und $108 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ für Triton X-100.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass SDBS in Anwesenheit von MKW metabolisiert wird. In Abwesenheit anderer Kohlenstoffquellen kann auch SDS von *Geobacillus thermoleovorans* verwertet werden. Ein Abbau nichtionischer Tenside wurde hingegen nicht beobachtet.

Die Anwesenheit nichtionischer Tenside ist daher, wie nach der Durchführung einer Diskriminanzanalyse bestätigt wurde, das wichtigste Entscheidungskriterium bzgl. der Anwendbarkeit des Verfahrens zur Reinigung bislang nicht experimentell untersuchter MKW-haltiger Abwässer. Basierend auf den versuchsbegleitend erhobenen Wachstumsparametern wurde ein Vorhersagemodell zur Übertragbarkeit des aerob-thermophilen Verfahrens entwickelt.

Geobacillus thermoleovorans weist eine hohe Resistenz gegenüber Bioziden, Schwermetallen und weiteren in Reinigungs- und Schmiermitteln eingesetzten Zusatzstoffen auf. Erst in Konzentrationen ab $1.500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bewirkt Antimon(III)oxid eine Inhibierung des Wachstums. Eine Anreicherung der genannten Substanzen im Abstrom der Anlage ist daher zu erwarten. Weiterer Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Aufklärung der Metabolisierungspfade von *Geobacillus thermoleovorans* in Bezug auf (Poly-)Ether und Biozide.

Bei der weiteren Verfahrensoptimierung ist insbesondere die Reduktion des Energiebedarfs der Anlage anzustreben. Darüber hinaus empfiehlt sich der Einsatz des Verfahrens in (sub)tropischen Ländern sowie die Ausnutzung von Prozesswärme. Die Entsorgung metallbelasteter Schlämme und anderer nicht abbaubarer Feststoffe ist sicher zu stellen. Bei der Behandlung von Kühlschmierstoffen und ähnlich hoch CSB-belasteten Abwässern (CSB: Chemischer Sauerstoffbedarf) ist die Bereitstellung von Verdünnungswasser notwendig, da eine Raumlast von $13 \text{ kg CSB m}^{-3} \text{ d}^{-3}$ die Belastungsobergrenze für das Verfahren darstellt.

Aufgrund der hohen Prozess-Stabilität, der kurzen Anlaufzeiten, der hohen Wachstumsraten und der einfachen Betreuung ist das Verfahren sehr flexibel und vielfältig einsetzbar. Eine weitere Vertiefung dieses innovativen Ansatzes in der Abwasserreinigung ist von daher wünschenswert.

Summary

The thermophilic microorganism *Geobacillus thermoleovorans* was able to use wastewaters contaminated with different mineral oils as sole source of carbon and energy in laboratory and pilot scale bioreactor experiments, when cultivated under aerobic conditions at 65 °C.

Artificial diesel oil and a water-miscible metalworking fluid of known composition were used as substrates. The suitability of cooling lubricants and rinsing solution (containing butyl cellosolve) for water-based paint fittings from automobile production facilities were examined as alternative substrates, testing their biodegradability. Detection of metabolites was performed using GC/FID (gas chromatograph - flame ionization detector). For these substrates, similar or higher growth rates and cell densities were achieved compared to the standard substrate (olive oil). Initialization of lipase expression has been found to be mandatory for efficient degradation of mineral oil hydrocarbons (MHC) by *Geobacillus thermoleovorans*.

Using the artificial diesel oil as substrate, several additives commonly used in combination with MHC were applied. Among these additives were surfactants and different flocculating, chelating and anti-foam agents.

When used below Critical Micelle Concentrations (CMC), all tested anionic surfactants (Sodium Dodecyl Sulfate = SDS; Sodium Dodecyl Benzyl Sulfonate = SDBS) and non-ionic surfactants (Tergitol NPX[®], Triton X-100) stimulated growth by enhancing the bioavailability of the substrates. Above CMC anionic surfactants promote growth, while non-ionic surfactants tend to become more inhibiting with increasing concentration. Extracellular lipase activity is completely inhibited by Triton X-100 at supra-CMC concentrations.

Both positive and negative growth effects are due to the surfactants' interaction with cell membrane structures, changing the membrane permeability. Higher membrane permeability results in enhanced enzyme excretion and higher degradation rates of MHC. On the other hand Triton X-100, because of its conformation, may clog the cell membranes and impede enzyme excretion or damage cell membranes or enzymes directly.

The CMCs of the surfactants for the thermophilic system were experimentally determined to be 50 mg·L⁻¹ for SDS and SDBS, 90 mg·L⁻¹ for Tergitol NPX[®], and 108 mg·L⁻¹ for Triton X-100.

Geobacillus thermoleovorans can degrade SDBS in presence of MHC and can also metabolize SDS as source of carbon in the absence of MHC. Degradation of non-ionic surfactants has not been observed.

The presence of non-ionic surfactants is the major criterion for assessing transferability of the thermophilic aerobic wastewater purification process to unknown MHC-contaminated wastewaters. A prediction model based on growth parameters has been derived by discriminant analysis to assess the biodegradability of other MHC-contaminated wastewaters.

Geobacillus thermoleovorans is innately insusceptible to biocides, heavy metals and other additives used in cleaning compositions or lubricants. Only Sb(III)oxide inhibited growth when concentrations exceeded $1.500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Therefore (poly)ethers and biocides may accumulate in the effluent of a treatment facility. To avoid negative effects on natural ecosystems or municipal wastewater treatment facilities, further studies are required regarding metabolism pathways of these components.

Process optimization should include minimization of energy input by utilization of process heat or implementation in (sub)tropical areas. Disposal of sludge loaded with non-biodegradable particles and metals has to be arranged. The degradation capacity of the wastewater treatment process is limited to $13 \text{ kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-3}$ (COD: Chemical Oxygen Demand). Therefore dilution water has to be provided, especially for the treatment of lubricants or wastewaters highly charged with COD.

High process stability, short lag times, high growth rates and simple operation routines make the proposed bioprocess highly recommendable for flexible and innovative wastewater treatment applications.

1 Einleitung

1.1 Mineralölkontaminierte Abwässer

Durch archäologische Funde ist die Nutzung von Erdöl und Erdölprodukten bereits prähistorisch belegt (Krejci-Graf, 1955). Dienten zähflüssige Teere (Erdpech = Asphalt, auch: Naphtha) in biblischen Zeiten noch zum Kalfatern der Arche Noah und trugen damit zur Rettung der Menschheit bei (Gen. 6,14), so wird heutzutage Erdöl zunehmend als „Tränen des Teufels“ (Barudio, 2001) verdammt, welche Unfrieden in die Welt bringen und bei ungehemmt durch deren Verbrennung fortgesetzter CO₂-Freisetzung in die Atmosphäre das Potenzial zur Vernichtung der Menschheit bergen (Alt, 2002).

Dieses gespannte Verhältnis zu einem „neutralen Rohstoff“ (Munif, 1990; zit. in Launer, 1991) entwickelte sich im Verlauf der vergangenen 150 Jahre, während derer sich das einstige Nischenprodukt zur omnipräsenten Grundlage der „Öl-Ära“ (US-Innenminister Ickes, 1933) entwickelte. Derzeit umfasst die petrochemisch erzeugte Produktpalette neben Treibstoffen, Heizölen, Schmierölen und Asphalt v. a. Pharmazeutika, Kunststoffe, Löse- und Düngemittel. Abgesehen von der des Öfteren ethisch wie ökologisch bedenklichen Gewinnung des Rohöls (vgl. Saro-Wiwa, 1991) ist auch die Entsorgung von Gebrauchsölprodukten aufgrund der anfallenden Mengen problematisch.

So wurden allein im Jahr 2003 105,7·10⁶ t Rohöl und 36,7·10⁶ t Mineralölprodukte im Wert von insgesamt 29,9·10⁹ Euro nach Deutschland eingeführt. Die Fördermenge in der Bundesrepublik betrug im selben Zeitraum 3,4·10⁶ t (Mineralölwirtschaftsverband, 2004). Zwar sind sowohl der Mineralölverbrauch wie auch der Schmierstoffbedarf im Inland seit 1998 leicht rückläufig (8,3 % bzw. 7,0 %), dennoch stammten hiervon insgesamt nur 6,3 % bzw. 9,5 % aus wiederaufbereiteten Quellen.

Zudem soll bis 2005 das Altölaufkommen durch die Ausnutzung verschiedener Einsparpotenziale auf von 459.000 t·a⁻¹ (1993) auf 320.000 t·a⁻¹ sinken (Kolshorn *et al.*, 1997). Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, besteht in der Weiterentwicklung der Trockenbearbeitung oder Minimalmengenschmierung in der Metallbearbeitung (Weinert, 1999), welche den Verzicht auf Kühlschmierstoffe bereits in ca. 10 % aller Anwendungsfälle ermöglicht (Petuelli, 2002). Sofern deren Wiederaufbereitung nicht möglich ist, werden Kühlschmierstoffe thermisch verwertet oder als Sondermüll verbrannt (VDI, 1999).

Ebenfalls in diesem Zusammenhang kann die Entsorgung von Abwässern aus Kfz-Reinigungsanlagen gestellt werden. Die Zahl der reinen Autowaschanlagen in Deutschland stieg von 506 im Jahr 1994 auf 1411 im Jahr 1999. Bei einem durchschnittlichen Wasserverbrauch für die Reinigung eines Fahrzeuges von 0,2 – 0,4 m³ (Chamorro Sanchez, 1998) und der Inhaltsstoffe (Emulgatoren, Abrieb- und Bodenpartikel, freies und emulgiertes Öl) stellen besondere Anforderungen an die Abwasserbehandlung und werden vor der biologischen und chemischen Behandlung durch Tauchwände in Öl- und Fettabscheidern abgetrennt (Panpanit *et al.*, 2000). Unzureichend ist die Wirksamkeit dieser Techniken allerdings in Bezug auf die Abtrennung fein dispergierter Emulsionen, Kolloide und Partikel < 20 µm. Diese wiederum beeinträchtigen konventionelle biologische Verfahren (Lemmer, 1999).

Ein möglicherweise effektiverer Entsorgungsweg bestünde in der betriebsinternen Verwertung mineralölkontaminierter Abwässer durch biotechnologische Kleinanlagen.

1.2 Stand der Forschung

Die Entwicklung des in dieser Arbeit vorgestellten Verfahrens wurde zum einen motiviert durch den Bedarf an Entsorgungsalternativen für MKW-kontaminierte Abwässer. Ein Lösungsansatz kombiniert dieses Problem mit dem Wissen um Mikroorganismen, die in der Lage sind Mineralölkohlenwasserstoffe zu verwerten. Gerade in den letzten Jahren stieg die Zahl der in der Literatur beschriebenen und charakterisierten Stämme (Kato *et al.*, 2001b; L'Haridon *et al.*, 2002) und Konsortien (Kapley *et al.*, 1999; Turkovskaya *et al.*, 1999), welche unter verschiedenen Umweltbedingungen Rohöle abbauen (Hao *et al.*, 2004) oder bei der Beseitigung von Ölverunreinigungen anwendbar sind (Chhatre *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2003), an. Zugleich mit deren Erforschung wuchs die Anzahl denkbarer Anwendungsmöglichkeiten.

Im Gegensatz zu dem in der Abwasserreinigung üblichen Prinzip der Verwendung mehr oder minder definierter Konsortien unter mesophilen Bedingungen beruht das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren allein auf einem einzigen, 1987 von Zarilla und Perry erstmalig beschriebenen thermophilen Organismus: (*Geo*)*Bacillus thermoleovorans*.

Verschiedene Forschungsgruppen befassten sich in den letzten Jahren intensiv mit unterschiedlichen *Geobacillus thermoleovorans*-Stämmen und beschrieben deren Isolierung und charakteristische Merkmale (Hebenbrock, 1998; Kato *et al.*, 2001a,c; Markossian *et al.*, 2000; Nazina *et al.*, 2001), wie sie auch in Abschnitt 2.1.1 zusammengefasst sind. Im Zuge dieser Forschungen stellte sich heraus, dass der Mikroorganismus neben Mineralöl-

kohlenwasserstoffen (MKW) auch Fette und Öle metabolisieren kann (Becker, 1999; Märkl und Antranikian, 2001; Reimann, 2003; Reimann *et al.*, 2002).

Das Spektrum untersuchter Mineralölkohlenwasserstoffe, welche *Geobacillus thermoleovorans* verwerten kann, beinhaltet neben den n-Alkanen C₁₃ - C₂₀ (Novotny und Perry, 1992, Zarilla und Perry, 1987) nachgewiesenermaßen auch niedermolekulare PAK mit bis zu drei Ringen (Annweiler *et al.*, 2000; Feitkenhauer, 1998; Hebenbrock, 1998). Darüber hinaus wurde von Annweiler *et al.* (2000) aufgrund der detektierten Metaboliten für den Abbau von Naphthalin durch *Geobacillus thermoleovorans* ein in der Literatur bisher nicht beschriebener Abbaupfad postuliert. Kinetische Untersuchungen zum Thema wurden von Feitkenhauer (1998) und Feitkenhauer *et al.* (2001, 2003a,b) durchgeführt und veröffentlicht.

Auch die Gewinnung und Charakterisierung von Enzymen, z. B. thermostabilen Lipasen, mit dem Ziel der industriellen Anwendung wurde von Lee *et al.* (1999, 2001) beschrieben. Uma Maheswar Rao und Satyanarayana (2003) beschäftigten sich mit der Stimulation der Produktion von α -Amylasen durch verschiedene Tenside. Da das von *Geobacillus thermoleovorans* produzierte Enzym auch ohne Ca²⁺-Zugabe stabil ist, könnte es zukünftig die biotechnologische Weiterverarbeitung von Stärke vereinfachen.

Milo *et al.* (1999) konnten dem hinzufügen, dass die Halbwertszeit der Catechol-2,3-Dioxygenase von *Geobacillus thermoleovorans* A2 unter aeroben Bedingungen mit 1,5 min ungewöhnlich gering ist. Die Fähigkeit zum Abbau von Phenol ist daher von der kontinuierlichen Biosynthese des Enzyms abhängig.

Parallel zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden bereits Anlagen mit dem Ziel der anaeroben und aeroben Verwertung fett- und ölhaltiger Abwässer aus der Lebensmittelindustrie konstruiert. Die Resultate der durchwegs erfolgreich durchgeführten Pilotexperimente wurden von Märkl und Antranikian (2001) und Reimann *et al.* (2002a,b) sowie Reimann (2003) für die anaeroben Anwendungen beschrieben. In Ergänzung dessen publizierten Taube *et al.* (2002) und Krüger *et al.* (2003) ihre Ergebnisse für den aeroben Anwendungsfall.

Die verfahrenstechnische Eignung des Organismus wurde somit bereits unter Beweis gestellt. Die thermophile aerobe Anwendung zum Abbau real existierender und komplexer mineralölkontaminierter Abwässer steht somit noch aus und ist das Ziel dieser Arbeit.

1.3 Die thermophile aerobe Verfahrensführung

Welche Vorteile die aerobe Betriebsweise mit einem thermophilen Mikroorganismus in der Abwasserreinigung bietet, wird im Folgenden erläutert. Die vorrangige Frage ist hierbei die nach der potenziellen Leistungsfähigkeit und der Anwendbarkeit des angestrebten Verfahrens.

Eigenschaften aerober Verfahren

Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens wird zum einen anhand der Wachstumsrate oder auch der Teilungsgeschwindigkeit der Organismen und damit der Abbaurate der anvisierten Substrate definiert. Beide Merkmale gehen Hand in Hand und betragen für thermophile Verfahren das 3- bis 10-fache gegenüber mesophilen Prozessen (LaPara und Alleman, 1999). Diese höheren Wachstumsraten bedingen einen bis zu 14 % höheren Sauerstoffbedarf als er für analoge mesophile Verfahren ermittelt wurde (Sürücü *et al.*, 1976). Die ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff ist, trotz dessen geringerer Löslichkeit bei hohen Temperaturen, kein Problem, da bei höheren Temperaturen der Sauerstoffdiffusionskoeffizient ansteigt (bei 60°C um 180 %) und beide Effekte sich somit gegenseitig kompensieren (d'Ans und Lax, 1992; Wynn *et al.*, 1997). Darüber hinaus verbessert sich die Bioverfügbarkeit der hydrophoben Substrate durch deren erhöhte Löslichkeit (Shaw, 1989a,b) sowie deren ebenfalls beschleunigte Diffusion zu den Zellen (Yaws *et al.*, 1995).

Weiteres Merkmal der Leistungsfähigkeit ist die Belastbarkeit des Verfahrens. Aerobe Hochlastverfahren reinigen Abwässer mit CSB-Werten von 5.000 - 10.000 mg·L⁻¹ (Zimpel, 1997). Damit präsentieren sich aerobe Verfahren zwar als weniger belastungsfähig als anaerobe Verfahren, jedoch sind letztere aufgrund der längeren Verweilzeiten in den Reaktoren (14-25 d, Märkl, 1999) und den hierdurch bedingten größeren Abmessungen für den mobilen Einsatz nur bedingt geeignet. Zudem weisen anaerobe Verfahren bis zur Entwicklung einer den Prozess tragenden Zelldichte sehr lange Anlaufphasen von bis zu 80 d auf (Collins *et al.*, 1998), wohingegen aerobe Verfahren innerhalb weniger Stunden nach der (Re-)Vitalisierung der Mikroorganismen voll einsatzbereit sein können (Krüger *et al.*, 2003; LaPara und Alleman, 1999; Taube *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil aerober Anlagen besteht in der im Gegensatz zu anaeroben Verfahren exzellenten Prozess-Stabilität (Kiyohara *et al.*, 2000).

Der Nachteil aerober Verfahren besteht im Allgemeinen darin, dass im Gegensatz zu anaeroben Verfahren die Nutzung von Biogas zur Deckung des betriebseigenen oder öffentlichen Energiebedarfs durch Verstromung nicht möglich ist. Dass der Anfall von

Schlamm und Schwebstoffen für aerobe Verfahren nicht höher liegen muss als bei anaeroben Verfahren konnten Taube *et al.* (2002) zeigen.

Eigenschaften thermophiler Verfahren

Darüber hinaus tragen die Temperaturen während der thermophilen Abwasserreinigung zu einer teilweisen Hygienisierung des Abwassers bei (Becker, 1999; Kabrick und Jewell, 1982), was gerade für Abwässer aus der Lebensmittelindustrie von Vorteil sein kann.

Die Effizienz thermophiler Verfahren leidet, sobald eine externe Wärmezufuhr zur Aufrechterhaltung der Betriebstemperatur notwendig ist. Um dies zu vermeiden, gilt deren Anwendung nur für Betriebe als wirtschaftlich sinnvoll, in welchen geeignete Abwässer die Reinigungsstufe prozesswarm erreichen (Kiyohara *et al.*, 2000). Alternativ käme noch deren Erhitzung per Wärmetauscher in Betracht. Eine Beschränkung thermophiler Verfahren auf derartige Einzelfälle ist jedoch, wie Kambhu und Andrews (1969) theoretisch berechneten und seither wiederholt bewiesen werden konnte (z. B. von Mohaibes und Heinonen-Tanski, 2004) nicht notwendig. Bei der mikrobiellen Verwertung hoch belasteter organischer Abwässer wird die zusätzliche Beheizung des Systems in vielen Fällen überflüssig, da exotherme Abbauprozesse zu dessen Eigenerwärmung führen.

Ein weiteres Argument, das gegen thermophile Verfahren ins Feld geführt wird, ist deren geringe Flockungsneigung. Ob entweder den Organismen selbst die physiologischen Voraussetzungen zur Flockenbildung fehlen (LaPara und Alleman, 1999) oder ob auch die reduzierte Artenvielfalt im thermophilen Temperaturbereich zu einer Reduktion der Flockenbildung beiträgt (Scheffler *et al.*, 1982), konnte noch nicht endgültig entschieden werden. Der Wegfall der für die Abtrennung der produzierten Biomasse notwendigen Sedimentation muss daher durch bauliche Maßnahmen kompensiert werden.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der High-Tech-Offensive Bayern. Die „Entwicklung eines Verfahrens zur mikrobiellen Reinigung fetthaltiger Abwässer bei Temperaturen über 60 °C“ war zwischen 01.10.2000 und 31.12.2003 das angestrebte Projektziel der Projektpartner Rauschert Verfahrenstechnik, Steinwiesen, dem Lehrstuhl für Hydrologie der Universität Bayreuth (Prof. R. Herrmann[†]), sowie des Lehrstuhls Biotechnologie 1 der Technischen Universität Hamburg-Harburg (Prof. H. Märkl). Nach der Erweiterung des Antrags auf das Gebiet der ölverunreinigten Abwässer ergaben sich in unmittelbarer Weise die Ziele und Inhalte der vorliegenden Arbeit:

- Die Verwertbarkeit unterschiedlicher Mineralölkohlenwasserstoff-Kontaminanten zu erforschen und eine der Fragestellung angepasste Analytik zu etablieren.
 - Die Belastbarkeit der Mikroorganismenkultur in Hinblick auf praxisrelevante Zusatzstoffe wie Detergenzien oder bakterizid wirkende Substanzen zu untersuchen.
 - Den Transfer von einzelnen Komponenten auf komplexe Abwässer aus verschiedenen Quellen zu vollziehen.
 - Die statistische Auswertung der Experimente und die Entwicklung eines Modells zur Prognose der Übertragbarkeit des Verfahrens auf weitere MKW-haltige Abwässer.
-

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Techniken

In diesem Kapitel wird insbesondere auf die Kultivierung des Mikroorganismus eingegangen, der für alle im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurde.

2.1.1 Der Mikroorganismus

Der Mikroorganismus *Geobacillus thermoleovorans* ist ein aerober, obligat thermophiler und chemotropher Endosporenproduzent mit der Fähigkeit zur Verwertung von Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW). Er wurde zuerst unter dem Namen *Bacillus thermoleovorans* von Zarilla und Perry (1987) beschrieben. Nach Aufklärung genetischer Gemeinsamkeiten mit *Bacillus* spp. und *Geobacillus* spp. durch Nazina *et al.* (2001) wird der Organismus der Gattung *Geobacillus* zugerechnet. Das Art-Epitheton leitet sich ab von den Worten „therme“ (griech. Hitze, warme Quelle), „oleum“ (lat. Öl) und „vorare“ (lat. verschlingen). Die Existenz thermophiler Bakterienstämme ist seit 1888 bekannt (Miquel, 1888, zit. in Zarilla und Perry, 1987).

Der Organismus ist katalase-positiv, grampositiv und stäbchenförmig von 1,5 - 2,0 µm Länge und 0,4 - 0,5 µm Breite. Die Endosporen werden terminal gebildet und erscheinen oval. Das Temperaturoptimum des Organismus liegt bei 65 °C mit einem Schwankungsbereich von 37 °C – 75 °C. Der optimale pH-Wert beträgt 6,5 und entspricht somit dem Neutralitätspunkt bei 65 °C (vgl. Amend und Shock, 2001). Der Valenzbereich erstreckt sich von pH 4 - 8. *Geobacillus thermoleovorans* kann mit Nitrat als Endelektronenakzeptor fakultativ auch anaerob existieren. Dagegen ist er wenig halotolerant (für $c(\text{NaCl}) \geq 2\%$ w:v wurde vollständige Inhibierung beobachtet) und exprimiert seine lipolytischen Enzyme nur induktiv (Amend und Shock, 2001; Becker, 1999).

Die MKW-Abbauversuche in der Anfangsphase des Projekts wurden mit dem von Prof. Märkl zur Verfügung gestellten, patentierten Stamm IHI-91 durchgeführt (Märkl und Antranikian, 2001). Die Laborfermenterexperimente wurden teilweise mit einer erworbenen Kultur des Stammes *Geobacillus thermoleovorans* (Nr. 11668, DSMZ, Braunschweig) durchgeführt, teilweise mit einer von der Technischen Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellten konzentrierten Sporensuspension.

Bei der periodisch durchgeführten optischen Kontrolle während aller Experimente zeigte sich eine morphologische Konstanz im Erscheinungsbild und konstantes Wachstumsverhalten. Deswegen, aufgrund der selektiven Bedingungen während der Kultivierung und u. U. auch wegen der zumindest für zwei Stämme nachgewiesenen Produktion von Bakteriozinen (Novotny und Perry, 1992) kann davon ausgegangen werden, dass alle Experimente mit *Geobacillus thermoleovorans* durchgeführt wurden. Da die im halbertechnischen Maßstab durchgeführten Experimente nicht unter vollständig sterilen Bedingungen durchführbar waren, wird die verwendete Kultur im Folgenden auch als thermophile Mikroorganismenkultur bezeichnet.

2.1.2 Das Kulturmedium

Zur Kultivierung von *Geobacillus thermoleovorans* wurde das Medium M2 nach Maßgabe von Hebenbrock (1998) verwendet. Hierbei wird eine Mineralsalzlösung mit einer Spurenelementlösung und einer Vitaminlösung angereichert und mit einem Phosphatpuffersystem stabilisiert. Die Zusammensetzung ist im Folgenden angegeben. Die Bezugsquelle der benötigten Chemikalien war die Firma Merck, Darmstadt, der Reinheitsgrad war mindestens pro Analyse.

Mineralsalzlösung:

NH ₄ Cl	1,00	g
MgCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10	g
KCl	0,04	g
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O	1,00	mg
H ₂ O dest.	ad 900	mL

Die Mineralsalzlösung wurde 45fach konzentriert angesetzt und im Dunkeln bei 4 °C vorrätig gelagert. Das Mineralmedium wurde nach Bedarf angesetzt, indem 200 mL des Konzentrats mit 9.000 mL destilliertem Wasser aufgefüllt wurden.

Spurenelementlösung:

nach DSMZ (2001) für Medium 141, zehnfach konzentriert

Nitrilotriessigsäure	15,00	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	30,00	g
NaCl	10,00	g
MnSO ₄ · 2 H ₂ O	5,00	g
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	1,80	g
ZnSO ₄ · 2 H ₂ O	1,80	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1,00	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,00	g
NiCl ₂ · 2 H ₂ O	0,25	g
KAl(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0,20	g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,10	g
H ₃ BO ₃	0,10	g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,10	g
NaSeO ₃ · 5 H ₂ O	3,00	mg
H ₂ O dest.	ad 1000	mL

Zuerst wurde die Nitrilotriessigsäure gelöst und mit 0,2 M KOH auf den pH-Wert 6,5 eingestellt. Anschließend wurden die Mineralien zugegeben und mit 0,2 M KOH der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Vitaminlösung:

nach DSMZ (2001) für Medium 141, zehnfach konzentriert

Pyridoxin-HCl	100,0	mg
Thiamin-HCl	50,0	mg
Riboflavin	50,0	mg
Nikotinsäure	50,0	mg
DL-Calciumpantothenat	50,0	mg
p-Aminobenzoessäure	50,0	mg
Liponsäure	50,0	mg
Biotin	20,0	mg
Folsäure	20,0	mg
Vitamin B 12	1,0	mg
H ₂ O dest.	ad 1000	mL

Phosphatpuffer:

Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,42	g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,38	g
H ₂ O dest.	ad 100	mL

Der pH-Wert des Phosphatpuffers mit 2 N HCl auf pH 6,5 eingestellt

Medium M2:

Mineralsalzlösung	900	mL
Phosphatpuffer	100	mL
Vitaminlösung	1	mL
Spurenelementlösung	1	mL
Kohlenstoffquelle	3	mM

Olivenöl wurde nach dem Vorbild von Becker (1999) als Standardkohlenstoffquelle gewählt. Die Medien und der Phosphatpuffer wurden, um möglichen Fällungsreaktionen vorzubeugen, separat autoklaviert. Um die vollständige Sterilisierung kontrollieren zu können, wurde Dampfstерilisationsklebeband (Merck, Darmstadt) verwendet.

Die Vitamine wurden durch Sterilfilter aus Zellulosenitrat mit 0,45 µm Porendurchmesser (Sartorius, Göttingen) filtriert und nach dem Autoklavierungsvorgang zugegeben. Die kohlenstoffhaltigen Substrate wurden in unbehandeltem Zustand im Anschluss an die Sterilisation zugegeben.

Das Medium wurde in dieser Form sowohl zur Durchführung der Wachstums- und Abbauxperimente in Inkubationskolben (vgl. Abschnitt 2.1.4.1) verwendet als auch für die Reaktorexperimente, wie sie in Abschnitt 2.1.4.2 beschrieben werden.

2.1.3 Vorkulturen - Stammhaltung

Die Anzucht von Vorkulturen für die Inkubationskolbenversuche erfolgte mit Olivenöl als Kohlenstoffquelle wie oben beschrieben. Die Überimpfung erfolgte dabei von Agar-Platten.

Um für die Experimente im Laborfermenter eine Inokulation mit vergleichbarer Zelldichte gewährleisten zu können, wurden verschiedene Methoden getestet. Die Herstellung gefriergetrockneter Sporenextrakte aus einer über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen erworbenen Kultur (Nr. 11668, DSMZ, Braunschweig) erwies sich als ebenso zuverlässige Inokulationsmethode wie die Verwendung der von der Technischen Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellten konzentrierten Sporensuspension. In 10-L-Kannistern geliefert, wurde diese bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Diese Lagermethode wurde von Reimann (2003) auf die Reproduzierbarkeit der Revitalisierung hin untersucht und als optimal für die Initiierung eines Abwasserbehandlungsprozesses auch nach über einem Jahr Lagerzeit beschrieben.

Die Herstellung gefriergetrockneter Sporenextrakte erfolgte hingegen wie im Folgenden beschrieben. Alle Schritte erfolgten unter Einhaltung steriler Kautelen.

Durch Inokulation des autoklavierten und betriebsbereiten Laborfermenters mit einer erworbenen *Geobacillus thermoleovorans* Kultur wurde durch wiederholte Zugabe von Olivenöl als Substrat eine hohe Zelldichte erlangt. Die Biomasse dieses Experiments wurde 30 min bei 5000 g (Megafuge 1,0 R, Heraeus Sepatech, Osterode) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zentrifugat dreimal mit 50 mmol·L⁻¹ Phosphatpuffer (pH = 7,6) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Rückstand in ca. 30 mL 50 mmol·L⁻¹ Phosphatpuffer suspendiert und gefriergetrocknet (Freeze Dryer Modulyo, Edwards, Crawley, England). Die gefriergetrockneten Sporen wurden in sterile, verschließbare Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Je eines dieser Gefäße diente im Folgenden als Inokulationskultur für ein Experiment im Laborfermenter, in welchem 4 - 8 h nach Inokulation eine Zelldichte von $5 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$ Zellen·mL⁻¹ herrschte.

2.1.4 Durchführung der Experimente

2.1.4.1 Experimente in Inkubationskolben

Schüttelkolbenexperimente kamen in den verschiedenen Projektphasen wiederholt zum Einsatz. Sie dienten sowohl dem Nachweis der Verwertbarkeit einzelner Substrate als auch zur Evaluierung der Laborfermenter-Experimente. Von Vorteil gegenüber dem Laborfermenter ist hierbei die Anzahl der zeitgleich durchführbaren Parallelexperimente.

Versuchsaufbau:

Material:

12 Stück 250 ml Schüttelkolben mit Schikanen

12 Stück 50 ml Schottflaschen

Horizontalschüttler

Wärmehaube

Photometer

Glasküvetten

Versuchsdurchführung:

Es wurden 250 mL fassende Inkubationskolben mit Schikanen (Wheaton, Millville, N. J., USA) mit je 50 mL autoklaviertem Medium und Vitaminlösung befüllt und die zu untersuchenden Einzelsubstanzen zugegeben. Die Lösung wurde unter der Wärmehaube Certomat H (B. Braun, Melsungen) bei 60 °C temperiert. Anschließend erfolgte die Animpfung durch eine Vorkultur. Jedes Experiment wurde in mindestens zwei Parallelen durchgeführt. Blindwerte wurden anhand nicht inokulierter Versuchsansätze erhoben. Ein

zusätzlicher Inkubationskolben wurde nur zum Abschluss des Experiments beprobt und gab Aufschluss über die ungestörte Wachstumsleistung.

Die Inkubationskolben wurden sofort nach Inokulation unter der Wärmehaube auf dem Horizontalschüttler (GFL, Burgwedel) mit einer Frequenz von 2 Hz inkubiert. Zur Bestimmung der Wachstumsparameter wurden den Inkubationskolben in einstündigen Intervallen 2 mL entnommen. Jeweils 1 mL der Kultur wurde in Eppendorfgläser überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das verbliebene Probenvolumen diente zur Bestimmung der optischen Dichte bzw. zur Bestimmung der Zelldichte (vgl. Abschnitte 2.4.1 und 2.4.2).

2.1.4.2 Reaktorversuche im autoklavierbaren Laborfermenter

Die meisten Versuche zur Aufklärung der Metabolisierbarkeit komplexer Medien wurden in einem autoklavierbaren Laborfermenter (ALF) durchgeführt, wie er in Abbildung 2-1 dargestellt ist. Dieser besteht aus einem Glasgefäß mit dem Arbeitsvolumen 2,5 L, das mit einem Doppelmantel zur Temperierung, einem externen Wasserbad (Umwälzthermostat), einer Steuerungseinheit und mehreren Pumpensystemen verbunden ist. Die komplette Anlage wurde von der Fa. Bioengineering (Wald, Schweiz) bezogen.

Zur Durchführung von Filtrationsexperimenten konnte noch ein zusätzlicher Umwälzkreislauf installiert werden. Hierbei konnte der Reaktorinhalt mittels einer magnetgekuppelten Gleitschieberpumpe (March, Kronberg) über ein dreikanaliges Cross-Flow-Filtrationselement mit einer Trenngrenze von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (TAMI, Hermsdorf) gelenkt werden. Bei Durchströmung des Filtrationselements mit einer ausreichend hohen Geschwindigkeit (ca. $3\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) wird das Anhaften von Organismen an die Keramikmembran verhindert und zugleich die Abscheidung eines zellfreien Permeats durch die Membran ermöglicht. Die Konstruktion des Elements entspricht einer Miniaturisierung der in der Pilotanlage verbauten Module (vgl. Abschnitt 2.1.4.3).

Über einen Temperatursensor (Pt-100) als Messwertgeber und das an einen Temperaturregelkreis gekoppelte externe Wasserbad wurde die Temperatur im Reaktorgefäß konstant auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Eine Sauerstoffelektrode, kombiniert mit einem $p(\text{O}_2)$ -Messumformer, ermöglichte die Messung des gelösten Sauerstoffes. Die Begasung erfolgte mit Pressluft über ein Begasungsrohr, dessen Öffnung sich zur Dispergierung der austretenden Gasblasen nahe am Boden des Glasgefäßes und an der Rührwelle befand. Die Begasungsrate konnte bedarfsabhängig geregelt werden. Wann immer dies nicht möglich war, wurde die Begasungsrate auf $150\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (1 vvm) eingestellt. Zur Entfeuchtung der Abluft

diente ein Abluft-Rückflusskühler. Die pH-Regelung erfolgte automatisch über Schlauchpumpen mit Säure (20 % H_3PO_4) und Lauge (0,5 M NaOH).

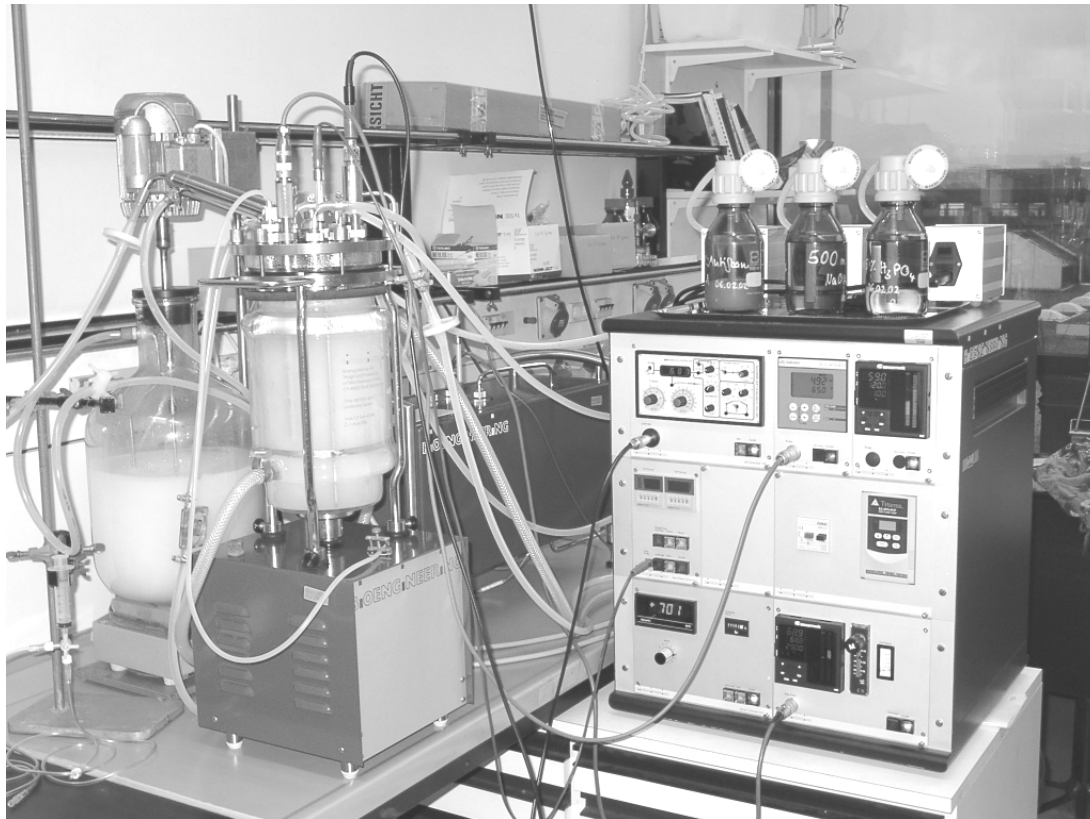


Abbildung 2-1: Aufbau des Laborfermenters. Von links: Vorlagebehälter, Reaktorgefäß, Wasserbad und Steuerungseinheit.

Der Laborfermenter wurde sowohl im Batch-Modus als auch kontinuierlich betrieben. Die Unterschiede in der praktischen Durchführung beider Verfahren sind in den folgenden Unterkapiteln erläutert.

Als Startsubstrat diente nach dem Vorbild von Becker (1999) für alle Experimente Olivenöl. Die jeweiligen Substrate wurden nach dem Erreichen einer mittleren Zelldichte ($\text{ca. } 1 \cdot 10^8 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$) zugegeben.

Fermentation im Batchbetrieb

Vor der Durchführung einer Batch-Fermentation wurde der Laborfermenter zunächst mit 2,3 L Mineralsalzlösung befüllt, mit allen sterilisationsbeständigen Aufbauten versehen und 30 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert (Zirbus, Osterode). Nach dem Abkühlen wurde das Reaktorgefäß auf das magnetgekoppelte Rührwerk gestellt und mit der externen Temperiereinrichtung, der Luftversorgung, sowie den Säure- und Laugendosierpumpen verbunden. Sodann wurden das entsprechende Volumen Phosphatpuffer, Spurenelementlösung und Vitaminlösung zugegeben.

Vor Beginn jedes Versuches wurde das Mineralmedium im Inneren des Fermentergefäßes auf ca. 65 °C temperiert, die p(O₂)-Sonde kalibriert, der pH-Wert des Reaktormediums auf 6,8 eingestellt und dieses ca. 10 min mit Sauerstoff begast. Anschließend wurden 16 mmol·L⁻¹ Olivenöl als Startsubstrat zugegeben und die Lösung mit ca. 1 mL in Phosphatpuffer resuspendierter, gefriergetrockneter Sporen oder 1 mL der Sporensuspension (vgl. Abschnitt 2.1.3) inokuliert. Während des Versuchsverlaufes konnten Flüssigkeiten durch ein Septum steril in den Laborfermenter injiziert werden. Darüber hinaus konnte bei Bedarf über eine weitere Dosierpumpe Entschäumer (Antifoam A, Sigma-Aldrich, Steinheim) zugeleitet werden.

Fermentation im kontinuierlichen Betrieb

Die Vorbereitung des Reaktorgefäßes erfolgte wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben. Ergänzend wurden in das System ein mittels einer Peristaltikpumpe (Alitea, jetzt: FIALab, Bellevue, USA) geförderter Zulauf sowie ein Überlauf integriert. Aus dem regelbaren Fördervolumen der Pumpen und dem über die Eintauchtiefe des Niveautauchrohrs bestimmten Arbeitsvolumen des ALF errechnet sich die hydraulische Retentionszeit (Verweilzeit) θ . Der Zulauf wurde so geregelt, dass die hydraulische Aufenthaltszeit im Laborfermenter je nach Experiment 8 - 42 h betrug.

$$\theta = \frac{V}{Q} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

θ	Verweilzeit [h]
Q	Zufluss [m ³ ·h ⁻¹]
V	Arbeitsvolumen [m ³]

Der Vorlagebehälter enthielt neben dem Medium M2 die jeweilige Kohlenstoffquelle. Hierbei handelte es sich entweder um 20 mmol·L⁻¹ des synthetischen Dieselöls (vgl. Abschnitt 2.2.1) oder unterschiedliche Kühlschmierstoffe in bekannter Verdünnung (s. Abschnitt 2.3). Da faktisch alle Substratansätze zur Entmischung oder Sedimentation neigten, wurde im Vorlagebehälter mittels eines Rührers (1360 Upm) die konstante Emulgierung gewährleistet. In Abbildung 2-2 ist ein schematischer Versuchsaufbau für die kontinuierlichen Experimente dargestellt.

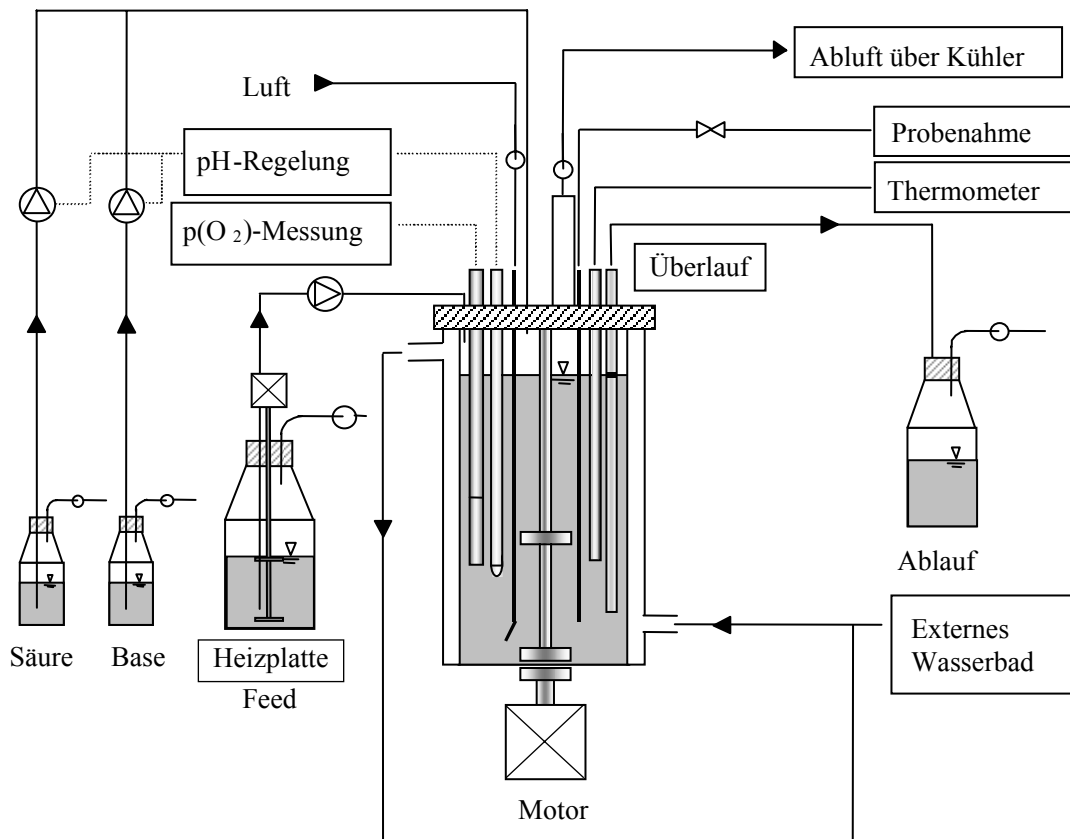


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau des Laborfermenters in kontinuierlicher Betriebsweise

2.1.4.3 Die Pilotanlage

Die mobile Pilotanlage war im Rahmen des Gesamtprojekts von der Fa. Rauschert Verfahrenstechnik, Steinwiesen, gebaut worden und wurde für Experimente im halbertechnischen Maßstab an fettbelasteten Abwässern eingesetzt. Für einen begrenzten Zeitraum stand sie auch zur Durchführung von Abbauprobversuchen mit Kühlschmierstoffen zur Verfügung.

Der schematische Aufbau der Anlage ist dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Laborfermenter analog, die Dimensionierungen der Ver- und Entsorgungsleitungen entsprechen jedoch den Anforderungen des 300 L fassenden Edelstahl-Reaktorbehälters. Dieser ist beheizbar, thermisch isoliert und kann mit bis zu 115 Upm turbulent durchmischt werden. Zusammen mit Vorlage- und Dosierungsbehältern, Pumpen und einer elektronischen Steuer- und Regelungseinheit mit automatischer Datenaufzeichnung war die Anlage in einem 20'-Standard-Container installiert. Dieser befand sich zur Zeit der Versuchsdurchführung auf dem Gelände des Städtischen Schlachthofs in Kulmbach.

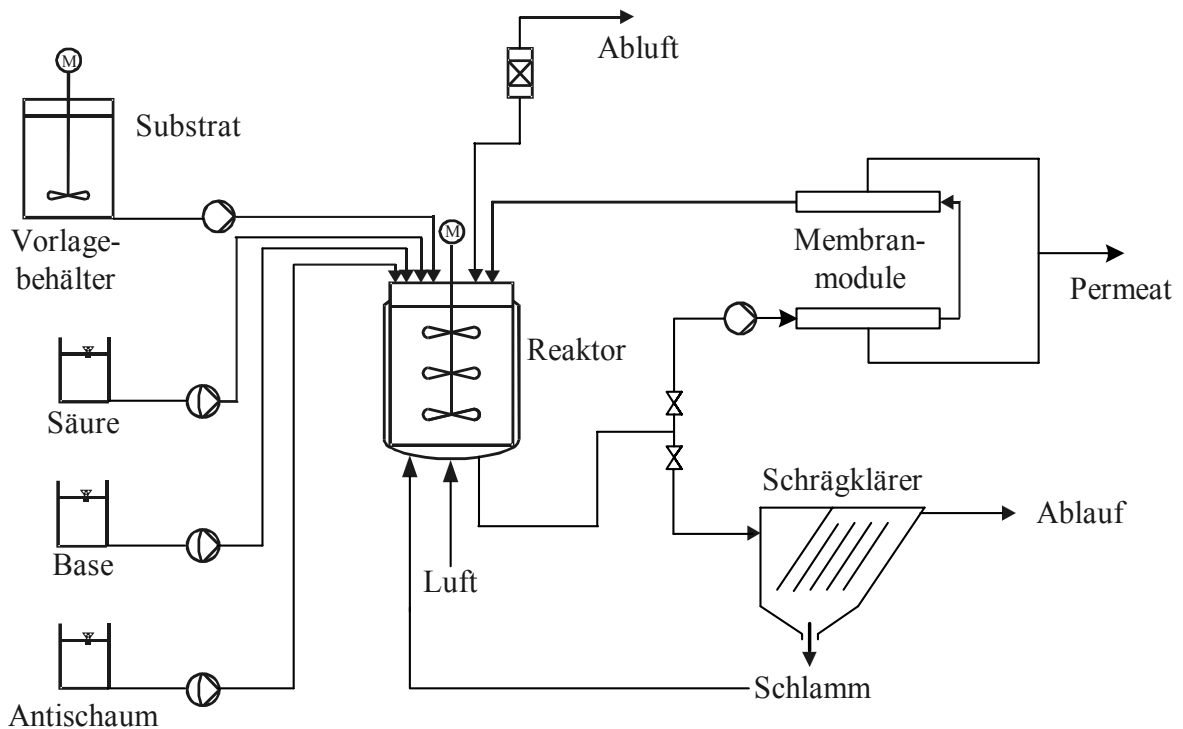


Abbildung 2-3: Fließschema der von der Fa. Rauschert Verfahrenstechnik, Steinwiesen, gebauten aeroben Pilotanlage. Die Zellrückhaltung erfolgte wahlweise über Cross-Flow-Membranmodule oder über einen Lamellen-Schräglklärer.

Zusätzlich befanden sich im bzw. am Container noch zwei unterschiedliche Systeme zur Zellrückhaltung. Bei den im Container angebrachten Filtermodulen handelte es sich um 2 in Edelstahlzylindern verbaute, keramische Röhren (Fa. Atech Innovations, Gladbeck). Diese dienen zur kontinuierlichen Aufreinigung des Reaktorinhalts unter einer transmembranen Druckdifferenz von 4,5 bar im Cross-Flow-Prinzip (technische Angaben: s. Tabelle 6-1 im Anhang). Um ein Zusetzen der Filteroberflächen zu vermeiden wurden die Filtermodule in 10 min Intervallen mit Druckluft (5 bar) zurückgespült und abhängig vom dennoch eintretenden Druckverlust nach 7 - 10 Tagen mit 25 % NaOH gereinigt.

Der außerhalb des Containers platzierte Lamellen-Schräglklärer war eine Konstruktion der Fa. Rauschert Verfahrenstechnik. Ein Flockungsmittel (Sachtoklar®, A.&E. Fischer-Chemie, Wiesbaden) wurde zur Koagulation der Biomasse eingesetzt. Diese abgesetzte Zellmasse wurde über ein Rücklaufsystem wieder dem Reaktor zugeführt.

2.2 Einzelsubstanzen

2.2.1 Repräsentative Mineralölkohlenwasserstoffe

Die Gruppe der ausgewählten MKW umfasst acht Verbindungen, welche als typische Bestandteile von Dieselölen gelten können. Aus Tabelle 2-1 ist die Zusammensetzung des

repräsentativen synthetischen Abwassers zu ersehen. Der endgültigen Auswahl vorangegangen waren Schüttelkolbenexperimente, wie sie in Abschnitt 2.1.4.1 beschrieben werden. Für das angegebene Volumen errechnet sich ein theoretischer CSB von 20,28 mol O₂ bzw. 0,16 mol·mL⁻¹, was einem theoretischen CSB von 5,12 g·mL⁻¹ entspricht.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung eines synthetischen mineralölkontaminierten Abwassers in Anlehnung an Dieselöle.

<i>Substrat</i>	<i>Gew.-%</i>	<i>V [mL]</i>	<i>Stoffmenge [mol]</i>	<i>Referenzen</i>
Tridecan	8,5	11,3	0,046	Bundt <i>et al.</i> (1991) Pál <i>et al.</i> , (1998)
Tertiärbutylcyclohexan	5,7	7,0	0,047	Atlas (1981), Solano-Serena <i>et al.</i> (1999).
Pristan	34,1	43,1	0,127	Obermajer <i>et al.</i> (2000) Wang <i>et al.</i> (1994b) Rontani <i>et al.</i> (1986)
Isooctan	22,7	32,8	0,199	Beens und Brinkmann (2000), Solano-Serena <i>et al.</i> (1999)
Toluol	10,0	11,5	0,109	Brown <i>et al.</i> (2000) Geerdink <i>et al.</i> (1996)
2-Methylnaphtalin	14,0	14,0	0,098	Pál <i>et al.</i> (1998) Perry (1979)
1-Hepten	5,0	7,2	0,051	Brown <i>et al.</i> (2000) Schindler (1997)
Summe	100	126,8	0,677	

2.2.2 Auswahl der Zusatzstoffe

Da unter praxisnahen Bedingungen das Vorhandensein von MKW-Kontaminationen ohne jegliche Additive eher unwahrscheinlich ist, wurde in der Folge der Einfluss von Zusatzstoffen auf die thermophile Kultur erforscht. Unter Zusatzstoffen wurden chemische Substanzen verstanden, die neben Mineralölkohlenwasserstoffen in Abwässern vorliegen können, z. B. in Kfz-Reinigungsanlagen, Kfz-Werkstätten oder Tankreinigungsanlagen. Marine Anwendungen wurden aufgrund der geringen Halotoleranz des Organismus ausgeschlossen.

Um einen Überblick über das Spektrum möglicher Inhaltsstoffe der betreffenden Abwässer geben zu können, werden in Tabelle 2-2 verschiedene Parameter aufgeführt, die für Abwässer aus einer Fahrzeugreinigungsanlage angegeben wurden. Der Vergleich dieser Werte zeigt deutlich, dass insbesondere Tenside, Öle und Schmierfette, suspendierte Feststoffe und Zink

(evtl. auch andere Metalle) in hohen Konzentrationen vorkommen. Der CSB aller Abwässer liegt innerhalb des für aerobe Verfahren üblichen Rahmens.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung von Abwässern aus Fahrzeugreinigungsanlagen

<i>Parameter</i>	<i>Pak (2000)</i> <i>[mg·L⁻¹]</i>	<i>Chamorro (1998)</i> <i>[mg·L⁻¹]</i>	<i>Lahti (1998)</i> <i>[mg·L⁻¹]</i>
CSB	420	3504	k. A.
BSB	118	230	k. A.
Gesamt-N	57	k. A.	k. A.
Gesamt-P	17,5	k. A.	k. A.
Suspendierte Feststoffe	337	2756	50 – 250
Detergenzien (LAS)	k. A.	224400	3 – 40
Öle und Schmierfette	k. A.	926	10 – 200
Zink	k. A.	k. A.	0,3 - 3
pH-Wert	k. A.	5 – 10	7 – 9,5

Bei der Literaturrecherche zur Auswahl der Zusatzstoffe war es unumgänglich auch auf Studien zurückzugreifen, die unter anderen Bedingungen als den hier maßgeblichen hinsichtlich Temperatur und Zusammensetzung des Reaktormediums durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden Angaben aus Patentschriften über die Zusammensetzungen kommerzieller Reiniger berücksichtigt. Eine repräsentative Auswahl der Inhaltsstoffe verschiedener Kfz-Reinigungsmittel zeigt Tabelle 6-2 im Anhang.

Wie dieser Zusammenstellung entnommen werden kann, stellen sowohl Tenside mit bis zu 30 Gew.-%, als auch Komplexbildner mit bis zu 15 Gew.-% die Hauptbestandteile von Reinigungsmitteln dar. Entsprechend dem für Kfz-Reinigungsanlagen typischen Spektrum an Kontaminationen wurden die im Folgenden beschriebenen Tenside und Zusatzstoffe zur Untersuchung ausgewählt. Auswahlkriterien waren hierbei die Repräsentativität innerhalb der anvisierten Abwasserkategorie und die Vielfalt der Zusatzstoffe in physikochemischer sowie anwendungsspezifischer Hinsicht.

2.2.2.1 Tenside

Für die Auswahl der Tenside waren zum einen die Häufigkeit der Verwendung und die globalen Produktionskapazitäten ausschlaggebend. Quiroga (1999) beschreibt z. B. Lineare Alkylbenzolsulfonate als die weltweit am häufigsten angewendete Klasse synthetischer Detergentien. Ein weiteres Kriterium stellte die Häufigkeit dar, mit welcher bestimmte

Tenside in Verbindung mit MKW auftreten. Dies ist einerseits in der Reinigung von Kfz oder Maschinen (Margesin und Schinner, 1998; Rudin und Lohr, 2000) der Fall, zum anderen während der Bioremediation von Schadensfällen (Guha und Jaffe., 1996; Volkering *et al.*, 1995).

Die Reinigungswirkung von oberflächenaktiven Substanzen (engl. surfactants, surface active agents) beruht darauf, dass diese aufgrund ihres Aufbaus aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Gruppe sich an der Oberfläche ihrer Lösung sowie an festen und flüssigen Grenzflächen anreichern. Sie erniedrigen die Oberflächenspannung zwischen Kohlenwasserstoffen und ihrer wässrigen Umgebung und lösen unpolare Substanzen, indem sich der hydrophobe Teil des Tensids an lipophile Substanzen anlagert und diese durch das polare Ende des Tensids in Lösung gebracht werden. Die hierdurch erhöhte Mobilität und vergrößerte Oberfläche der hydrophoben Schadstoffe führt zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit für die Mikroorganismen (Laha und Luthy, 1991; Margesin und Schinner, 1999).

Tabelle 2-3: Ausgewählte Tenside und deren Einsatzgebiet.

<i>Tensidklasse</i>	<i>Name</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Referenzen</i>
Anionisch	Natriumlaurylsulfat (SDS, engl. Sodium Dodecyl Sulfate)	Bioremediation, Oberflächenreinigung leicht abbaubar	Thiem (1994) Deschenes <i>et al.</i> (1996) Margesin und Schinner (1999)
	Natriumlaurylbenzolsulfonat (SDBS, engl. Sodium Dodecyl Benzyl Sulfonate)	Bioremediation BTpX, Kfz-Reinigung	Goudar <i>et al.</i> (1999) Bertrem <i>et al.</i> (2000) Rudin und Lohr (2000)
Nichtionisch	Triton X-100 (Octylphenolpolyethylenglycolether)	Bioremediation Böden und Wässer	Boonchan <i>et al.</i> (1998) Liu <i>et al.</i> (1995) Guha und Jaffe (1996)
	Tergitol® NPX (Nonylphenoxy-polyethoxyethanol)	Bioremediation Böden und Wässer	Witworth <i>et al.</i> (1973) Laha und Luthy (1991) Volkering <i>et al.</i> (1995)

Ab dem Überschreiten einer bestimmten Tensidkonzentration aggregieren Tensid-Monomere in Mizellen. Diese Konzentration wird kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC, engl. Critical Micelle Concentration) genannt. Im Bereich dieser Konzentration ändern sich die Eigenschaften der Tensidlösung, z. B. Oberflächenspannung, elektrische Leitfähigkeit, Viskosität und osmotischer Druck (Kosswig und Stache, 1993). Es war daher zu erwarten, dass die Löslichkeiten der Substrate und evtl. deren Aufnahme in die Zellen sich abhängig vom Überschreiten der CMC des jeweiligen Tensids verändern würden.

Die CMC ist jedoch kein feststehender Wert, sondern nimmt mit steigender Ionenstärke der Lösung ab und mit Zunahme der Temperatur zu (Kosswig und Stache, 1993). Da die in der Literatur angegebenen Werte zumeist in vollentsalztem Wasser bei Zimmertemperatur ermittelt wurden, waren diese nicht auf das hier betrachtete System übertragbar. Deshalb wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Techniken die CMC der zu untersuchenden Tenside im Mineralmedium M2 bei der Betriebstemperatur von 65 °C experimentell bestimmt (s. Abschnitt 2.5.3).

In Beschränkung auf die wirtschaftliche Bedeutung der Tensidgruppen wurde auf die Auswahl amphoterer sowie kationischer Tenside verzichtet. Amphotere Tenside, z.B. Alkylbetaine, gelten als gut abbaubar und wascheffektiv, wenngleich teuer. Kationische Tenside dagegen sind als biologisch schwer abbaubar beschrieben und haben eine vergleichsweise geringe Waschwirkung. Sie werden als Weichmacher und zunehmend als Desinfektionsmittel verwendet (Comber *et al.*, 2000; Falbe, 1987). Beispielhafte Strukturformeln aller genannten Tensidklassen sind in Tabelle 6-3 im Anhang zusammengestellt.

2.2.2.2 Ethylendiamintetraacetat

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) findet als synthetischer Komplexbildner vielfältige Anwendung, z. B. in Reinigungsmitteln für Kraftfahrzeuge (Levitt, 2000; Neil, 1984). Für das vorliegende System war deshalb von Interesse, ob EDTA dem Reaktormedium und damit dem Mikroorganismus Spurenmetalle entzieht, so dass diese nicht mehr zur Stimulation verschiedener Stoffwechselvorgänge zur Verfügung stehen. Es sollte ermittelt werden, ob und wie schnell EDTA inhibierend oder letal auf die Mikroorganismen wirkt. Gemäß Bertrem *et al.* (2000) wurden die Konzentrationen 30 mg·L⁻¹ und 130 mg·L⁻¹ zu Experimentalzwecken gewählt, wobei die zweite Konzentration eine Grenzbelastung simulieren sollte.

2.2.2.3 Antimon und Zink

Da Waschwässer und Kühlschmierstoffe während ihrer Verwendung intensiven Kontakt mit metallischen Oberflächen erfahren, waren für diese Abwässer neben Tensiden und Komplexbildnern erhöhte Konzentrationen an Metallionen zu erwarten. Der Mitteilung eines Mitarbeiters der Firma GM Wassertechnik (Bad Abbach) zufolge sind in Abwässern aus Kfz-Reinigungsanlagen insbesondere Zink- und Antimonoxide in Konzentrationen oberhalb der Grenzwerte nachzuweisen (Zn: 5,0 mg·L⁻¹, Sb: 0,5 mg·L⁻¹; Europäische Union, 2000). Als Quelle für diese Oxide wurde weniger die Karosserieverzinkung als vielmehr Abriebmaterial von Bremsbelägen angegeben. Die Konzentrationen von Zink(II)oxid in Waschwässern betragen 700 - 1100 mg·L⁻¹, während die Werte für Sb(III) und Sb(V) im Rhythmus des

jahreszeitlich bedingten Streusalzeintrags zwischen $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ schwanken. Die beiden Metalloxide wurden deshalb in diesen Konzentrationsbereichen eingesetzt.

2.2.2.4 Kommerzielle Zusatzstoffe

Um eine Anwendung des Verfahrens unter praxisnahen Bedingungen zu simulieren, wurden des Weiteren kommerzielle Zusatzstoffe für Kfz-Reinigungsanlagen ausgewählt. Dabei fiel die Wahl zum einen ein Shampoo für Waschpoliermaterial mit dem Namen "124 Polin® Schaumshampoo" (KAW Kiehl, Odelzhausen), dessen bakterizide Wirkung die Geruchsbildung hemmen sollte. Als Inhaltsstoffe wurden amphotere und nichtionische Tenside und Duftstoffe angegeben. Das Konzentrat hatte einen pH-Wert von 8,5 und sollte der Waschzone pur bis 1:10 verdünnt über eine Dosierpumpe zugeführt werden. Der Verbrauch beläuft sich auf ca. 10 - 15 mL Konzentrat pro Kraftfahrzeug.

Von der gleichen Firma wurde darüber hinaus ein Flockungsmittel zur Behandlung von Brauch- und Abwässern in Autowaschanlagen mit dem Namen „303 Spezial-Flockungsmittel“ bezogen. Als Inhaltsstoffe waren polymere Aluminiumsalze und Flockungshilfsmittel angegeben, wobei der pH-Wert im Konzentrat ca. 3 betrug. Das Produkt soll pur über eine Dosierpumpe in die Waschzone gelangen. Der Verbrauch beträgt ca. 40 - 100 mL pro 1.000 L Reinigungswasser.

Beide Substanzen wurden in den vom Hersteller technisch empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Darüber hinaus wurde eine dreifache Überdosierung des Mittels Polin® simuliert.

2.3 Kühlschmierstoffe

Kühlschmierstoffe (KSS) finden vor allem in der Metall verarbeitenden Industrie Verwendung. Wie bereits die Bezeichnung impliziert, ist das Ziel des Einsatzes von Kühlschmierstoffen zum einen, die durch Reibung entstehende Wärme abzuführen und damit die beteiligten Maschinenteile zu kühlen. Zum anderen verringern KSS durch ihre schmierende Wirkung und den Abtransport von Abriebmaterial und Spänen den Verschleiß und erhöhen damit die Standdauer der Maschinen (Kleber, 2000).

Als Grundsubstanz für KSS dienen mineralische oder pflanzliche Öle. Zur Optimierung bestimmter Eigenschaften wie Haltbarkeit oder Kühlwirkung und zur Konservierung der Emulsionen dient eine Vielzahl von Additiven. Hierbei sind besonders Bakterizide, Entschäumer, Tenside und pH-Stabilisatoren zu nennen. Als Sekundärstoffe werden Inhaltsstoffe von KSS bezeichnet, die erst während der Nutzung eingetragen werden, z. B.

Reaktionsprodukte aufgrund thermischer Zersetzung, Abriebmaterialien oder mikrobielle Abbauprodukte.

2.3.1 Standardmischung KSS A

Die Standardmischung KSS A der Firma Henkel KGaA, Düsseldorf, ist ein wassermischbarer, halbsynthetischer Kühlschmierstoff. Nach DIN 51521 (1999) ist ein wassermischbarer Kühlschmierstoff ein Kühlschmierstoff, der vor seiner Anwendung mit Wasser gemischt wird. Dabei entsteht eine milchig-trübe Öl-in-Wasser-Emulsion. KSS A wird als Konzentrat ausgeliefert und in einem 5 %-Ansatz mit Wasser verwendet.

KSS A zählt zu einer Produktklasse von Schmierstoffen zur Span abhebenden Metallbearbeitung. Kundenspezifischen Anforderungen entsprechend wird KSS A in modifizierten Rezepturen unter verschiedenen Handelsnamen vertrieben.

Im Anhang sind in Tabelle 6-4 die Inhaltsstoffe in anonymisierter Form nach deren Struktur und Funktion beschrieben. Detaillierte Angaben über die Zusammensetzung des KSS liegen vor, stehen jedoch als geistiges Eigentum der Firma Henkel nicht zur Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung. Diesbezügliche Fragen sind direkt an die deutsche Firmenzentrale in Düsseldorf zu richten.

Da wassermischbare KSS als anfälliger für mikrobiellen Befall gelten, enthält auch die untersuchte Mischung bakterizid wirkende Substanzen (Henkel KGaA, 2003). Inwiefern sich diese bioziden Komponenten auf die Vitalität der Mikroorganismen auswirken und ob dieses praxisnahe, MKW enthaltende Gemisch durch die thermophile Kultur verwertbar ist, wurde in diesem Zusammenhang untersucht.

2.3.2 Teilströme der Automobilproduktion

Die Firma Audi AG stellte im Rahmen dieses Projektes ebenfalls mineralölkontaminierte Abwässer und Schmierstoffe aus Ihren Produktionsanlagen zur Verfügung. Diese KSS und Spüllösungen enthielten aufgrund ihres Einsatzes im Produktionsprozess weitere dem Verwendungszweck angepasste Additive sowie Abriebmaterialien und Oberflächenbehandlungsmittel der zugehörigen Werkstücke. Die Angabe von Zusammensetzungen ist daher im Vergleich zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Standardmischung erschwert und variiert in der Praxis mit der vorherigen Verwendungsdauer der Kühlschmierstoffe.

2.3.2.1 Kühlschmierstoffe

Der Einsatz und die Entsorgung von KSS tragen laut Schmidt (2000) und Weinert (1995) 7 - 17 % zu den Herstellungskosten eines Automobils bzw. Werkstücks bei. Entsprechend werden spezifisch auf die jeweiligen Bearbeitungsprozesse abgestimmte KSS bei dem Automobilhersteller Audi AG in Ingolstadt eingesetzt. Deren Haltbarkeit beträgt über ein Jahr im Dauereinsatz (mündl. Mitteilung Robien, 2003; Weinert, 1999). Anschließend werden die mit Metallspänen durchsetzten und bakterizide Additive enthaltenden Lösungen entsprechend dem derzeitigen Stand der Technik einer Entsorgung durch thermische Verwertung zugeführt. Eine genauere Beschreibung der Zusammensetzung der KSS ist Tabelle 2-4 zu entnehmen.

Tabelle 2-4: Anwendungsbereich und Zusammensetzung der Kühlschmierstoffe aus der Kfz-Produktion (Audi AG, Ingolstadt).

<i>Funktion</i>	<i>Aluminiumbearbeitung</i>	<i>Laugenmischemulsion</i>	<i>Graugussbearbeitung</i>
Schmierstoff	Mineralöl	Fettsäure, langkettig Alkanolaminborate	Ester, synthetisch Fettalkoholalkoxylat, mittelkettig Fettsäurederivat
Bakterizid	Triazinderivate	Triazinderivat	Oxazolodinderivate Triazinderivat
Fungizid	Carbamat	Carbamat	Carbamat
Entschäumer	Glycolderivate	Glycolderivate Polyethersiloxane	Glycolderivate
pH-Stabilisator	Alkanolamine	Alkanolamine, Ether	Alkanolamine
Tenside	anionisch	nichtionisch	nichtionisch, anionisch
Sonstiges	Korrosionsschutz	-	Korrosionsschutz

Entsprechend der ermittelten CSB-Werte (vgl. Tabelle 2-2) wurden diese KSS in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

2.3.2.2 Spüllösung zum Reinigen der Lackleitungen

Aus den Kfz-Produktionshallen gelangen vorgefertigte Karosserien in die Lackiererei, in der diese grundiert und spritzlackiert werden. Jeder Wechsel der Lackfarbe erfordert die Reinigung der Leitungen und Armaturen, die in direktem Kontakt zu den Lacken stehen. Zur Entfernung der Rückstände wasserbasierter Lacke wird hierbei eine spezielle Spüllösung verwendet. Die frische Spüllösung besteht zu knapp 90 % aus Wasser, in dem 9,8 % 2-Butoxyethanol (BE, auch Butylglycolether) gelöst sind. Darüber hinaus sind in der Lösung 0,3 % Primäramine enthalten.

Während des Reinigungsvorgangs nimmt die Lösung die Bestandteile verschiedener Lacke auf, d. h. Aluminiumflitter von Metalllacken, Pigmente, Acrylharze und Bariumsulfat (Füller). Diese Feststoffe sind biologisch nicht abbaubar und wurden vor der Verwendung als Kohlenstoffquelle für die Mikroorganismenkultur durch eine Fällung entfernt. Die Laborfermenter-Experimente mit der Spüllösung zielten daher auf die Untersuchung der Abbaubarkeit von BE.

2-Butoxyethanol, ein Alkylglycolether, dient als Lösungsvermittler zwischen organischer und wässriger Phase. Die Resorption dieser kanzerogenen Stoffgruppe erfolgt leicht über die Haut oder durch Inhalation. Eine Schädigung von Leber, Lungen oder Nieren ist hierbei möglich (Eisenbrand und Metzler, 2001).

Um die oben erwähnten Feststoffe aus der Spüllösung auszufällen, wurden dieser $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ einer 1 M Fe(II)SO_4 -Lösung zugegeben. Nach der Homogenisierung des Ansatzes sedimentierten die gebildeten Feststoffflocken innerhalb von 30 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und entsprechend des ermittelten CSB in unterschiedlichen Verdünnungen für die Reaktorexperimente verwendet.

2.4 Prozessüberwachung

Während aller Experimente wurden regelmäßig, d. h. zumeist in Intervallen von 1 h, Proben aus den Inkubationskolben bzw. dem Laborfermenter entnommen. Während der im ALF durchgeführten Experimente wurden zusätzlich die an der Regelungseinheit ablesbaren Parameter Temperatur, pH-Wert und gelöster Sauerstoff protokolliert.

Aufgrund der stark variierenden Zusammensetzung der untersuchten Abwässer wurden unterschiedliche Methoden zur Prozessüberwachung verwendet und entwickelt. Alle in diesem Unterkapitel vorgestellten Verfahren wurden jedoch einheitlich mit frischem Probenmaterial unmittelbar im Anschluss an die Probenahme durchgeführt.

2.4.1 Messung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der OD wurde der gezogenen Probe ein Aliquot entnommen, in eine Küvette (Hellma, Mühlheim) überführt und die optische Dichte bei 610 nm ($\text{OD}_{610\text{nm}}$) an einem Photometer (Spectroquant Nova 400, E. Merck, Darmstadt) gemessen. Bei Extinktionen, die außerhalb des linearen Bereiches des Photometers, d. h. einer Extinktion von $0,3$ (Lambert-Beer'sches Gesetz) lagen, wurde die Probe mit physiologischer Saline ($0,9 \text{ \% NaCl w:v}$) verdünnt, homogenisiert und erneut gemessen. Die Berechnung der optischen

Dichte erfolgte dann über das Verdünnungsverhältnis. Die Küvetten wurden vor der erneuten Verwendung zweifach mit Ethanol und vollentsalztem Wasser gespült und getrocknet.

2.4.2 Gesamtzelldichte

Die Gesamtdichte der vitalen Zellen in der Einheit [Zellen·mL⁻¹] gibt Aufschluss über die Entwicklung der thermophilen Kultur und zeigt an, ob die Umweltbedingungen sich zu deren Vor- oder Nachteil verändern.

Die Anzahl der aktiven Organismen wurde lichtmikroskopisch (Zeiss, Jena) bei 400-facher Vergrößerung mit einer Zählkammer nach Neubauer (Firma Assistent, bezogen über Ochs, Bovenden-Lenglern) ermittelt. Die Kammertiefe betrug 0,02 mm, die Fläche pro Kleinquadrat 0,0025 mm². Ein Zählfeld der Zählkammer bestand aus 16 Großquadraten, wovon jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt war. Falls notwendig wurden die Proben verdünnt, so dass die Zelldichte zwischen 10 und 100 Zellen pro Großquadrat lag. Die Anzahl der stäbchenförmigen Zellen wurde in mindestens 4 Großquadraten gezählt und das arithmetische Mittel errechnet. Aus den Abmessungen der Zählkammer und der Verdünnung berechnet sich die Gesamtzelldichte nach:

$$\text{Gesamtzelldichte [Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}] = 1,25 \cdot 10^6 \cdot \bar{\mu}(\text{Zellen Großquadrat}) \quad \text{Gleichung 2-2}$$

2.4.3 Bestimmung der Lipaseaktivität mit p-Nitrophenyllaurat

Die Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte nach einer Methode von Sigurgísladóttir (1993), die für die Anwendung auf den Fall der thermophilen Kultur modifiziert wurde.

Das Enzym Lipase reagiert dabei wie in Abbildung 2-4 dargestellt mit dem chromogenen Substrat p-Nitrophenyllaurat (pNPL; Fluka, Buchs) zu p-Nitrophenol, einem Farbstoff, dessen Extinktion bei 420 nm photometrisch gemessen wird. Die Menge an Lipase in einer Probe ist direkt proportional zu der Extinktion und demzufolge zur Lipaseaktivität in [U·mL⁻¹].

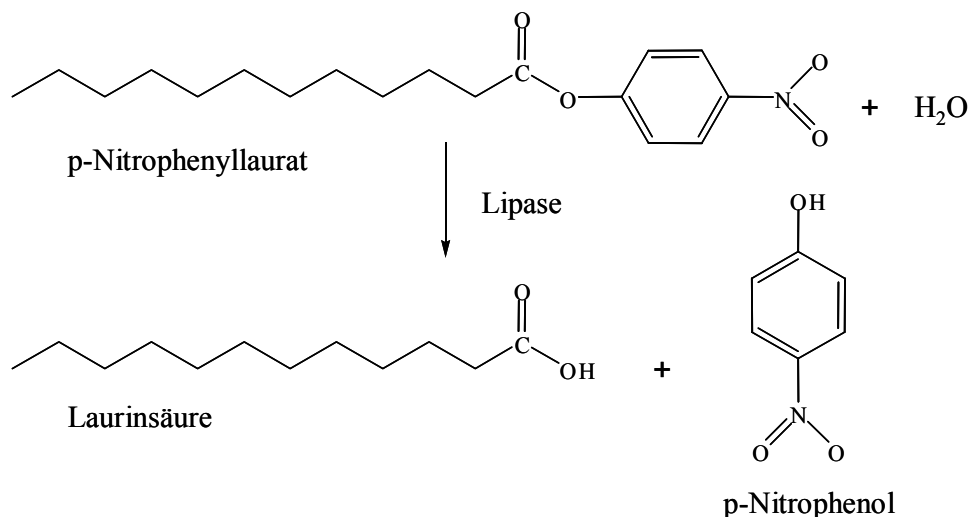


Abbildung 2-4: Reaktion von p-Nitrophenyllaurat zu p-Nitrophenol nach Sigurgísladóttir (1993).

Reagenzien:

25 mmol·L⁻¹ pNPL in abs. Ethanol (gelagert bei - 18 °C)

50 mmol·L⁻¹ Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2)

0,1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ (gelagert bei 4 °C)

Durchführung:

In ein Eppendorfgefäß wurden 650 µL des Natrium-Phosphatpuffers vorgelegt. Unmittelbar nach der Probenahme wurden 250 µL der Probe und anschließend 100 µL der pNPL-Lösung zugegeben. Nach der Homogenisierung des Gemisches wurde das Gefäß 20 min auf einem auf 60 °C temperierten Horizontalschüttler (2 Hz) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 250 µL kaltes Na₂CO₃ zugegeben, das Gemisch für 1 min durch Schütteln homogenisiert und anschließend 10 min lang bei 20.000 g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg). Die Extinktion des Überstandes wurde gegen einen Blindwert (BW), der statt der Probe Phosphatpuffer enthielt, mit Hilfe eines Photometers bei 420 nm gemessen. Die Berechnung der volumenspezifischen Lipaseaktivität erfolgte nach Klatt (2001) entsprechend folgender Formel, wobei als ein Unit [U] die Enzymmenge definiert wurde, die aus dem Substrat pro Minute 1 mmol p-Nitrophenol freisetzt:

$$\text{Aktivität} \left[\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \right] = \frac{\text{Ext}_{420\text{nm}}(\text{Probe}) - \text{Ext}_{420\text{nm}}(\text{BW})}{7,22} \cdot \frac{V_{\text{Ansatz}} [\text{mL}]}{\text{Inkubationsdauer} [\text{min}] \cdot V_{\text{Probe}} [\text{mL}]}$$

Gleichung 2-3

Um den linearen Bereich des Photometers und den molaren Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer-Gesetz zu bestimmen, wurde das Photometer mit p-Nitrophenollösungen (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Konzentrationsbereich von 0 - 0,1 mmol·L⁻¹ kalibriert. Dazu wurden 650 µL Phosphatpuffer vorgelegt, statt der Probe 250 µL Phosphatpuffer und anstelle des p-Nitrophenyllaurats verschieden konzentrierte p-Nitrophenollösungen in absolutem Ethanol zugegeben und bei 420 nm gemessen. Bei Extinktionen außerhalb des Kalibrierbereiches wurde die Probe mit einem definierten Volumen Phosphatpuffer verdünnt, homogenisiert und erneut gemessen. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol betrug 7,22 und entsprach der Steigung der Regressionsgerade der Kalibrierfunktion des Photometers.

2.4.4 Bestimmung der Tenside

2.4.4.1 Anionische Tenside: Lösungsmittlextraktion mit Ethylviolett

Die Bestimmung der anionischen Tenside Natriumlaurylsulfat (SDS) und Natriumlaurylbenzolsulfonat (SDBS) erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Motomizu (1982). Durch die Reaktion des kationischen Farbstoffes Ethylviolett mit anionischen Tensiden bildet sich ein Salz (Ionenassoziat), das anschließend in ein unpolares Lösungsmittel, in diesem Fall Toluol, extrahiert wird. Die Konzentration des Reaktionsprodukts in der organischen Phase wurde photometrisch bei 615 nm bestimmt. Die Addition von 1 mol·L⁻¹ Natriumsulfat diente der Beschleunigung der Phasentrennung, die Zugabe von 0,02 mol·L⁻¹ EDTA der Reduzierung von Interferenzen mit verschiedenen Metallionen.

Reagenzien:

1 mmol·L⁻¹ Ethylviolett (Fluka, Buchs) in vollentsalztem Wasser

0,2 mol·L⁻¹ Natriumacetatpuffer (pH 5)

mit 1 mol·L⁻¹ Na₂SO₄ und 0,02 mol·L⁻¹ EDTA

Toluol nanograd

Durchführung:

1 mL der Probe wurde in ein Reagenzglas vorgelegt und bei Bedarf verdünnt, so dass $c(\text{Tensid}) \leq 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nach Zugabe von 500 µL Natriumacetatpuffer, 200 µL Ethylviolett-lösung und 1 mL Toluol wurde das Reagenzglas verschlossen und 10 min lang durch Schütteln homogenisiert. Nach 5 min Standzeit zur Phasentrennung wurde die organische Phase in eine Küvette überführt und die Extinktion gegen einen Reagenzienblindwert bei

615 nm gemessen. Zur Umrechnung der Extinktionen wurden Kalibrierfunktionen mit verschiedenen Konzentrationen an SDS und SDBS von 0 - 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erstellt.

2.4.4.2 Nichtionische Tenside: Lösungsmittlextraktion mit Kaliumpikrat

Die Bestimmung der nichtionischen Tenside Triton X-100 und Tergitol[®] NPX erfolgte gemäß einer Methode von Merino-Teillet (1987). Das Prinzip basiert auf der Bildung eines Komplexes aus Tensid und Kaliumpikrat und der anschließenden Extraktion des Komplexes in 1,2-Dichlorethan. Nach Abtrennung der organischen Phase kann der Komplex photometrisch bei 380 nm bestimmt werden.

Die Methode wurde durch die Zugabe von Ethanol zu dem Reaktionsansatz dahingehend modifiziert, dass die Sensitivität verbessert, die Extraktion des Komplexes beschleunigt und die Bestimmungsgrenze auf 0,05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gesenkt wurde. Kalibrierfunktionen wurden im Bereich 0,05 - 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erstellt.

Reagenzien:

2,25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 in vollentsalztem Wasser

mit 14 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH

20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pikrinsäure (getrocknet über Phosphorpentoxid)

Absoluter Ethanol

1,2-Dichlorethan

Durchführung:

In ein Reagenzglas wurde 1 mL Probe vorgelegt und gegebenenfalls auf $c(\text{Tensid}) \leq 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ verdünnt. Sodann wurden 300 μL absoluter Ethanol, 6 mL Kaliumnitratlösung und 1,5 mL Pikrinsäure zugegeben und homogenisiert. Danach wurde mit 1 M KOH der pH-Wert auf $12 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch mit vollentsalztem Wasser auf ein Endvolumen von 15 mL aufgefüllt und erneut homogenisiert. Nach Zugabe von 750 μL 1,2-Dichlorethan wurde das Reagenzglas mit einem Stopfen versehen und 3 min auf einem Horizontalschüttler extrahiert. Nach einer Standzeit von 5 min wurde die untere, d. h. organische Phase in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 380 nm gegen einen Blindwert, der statt des Tensids vollentsalztes Wasser enthielt, gemessen. Die Kalibrierfunktionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Triton X-100 und Tergitol[®] NPX von 0,4 - 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erstellt.

2.5 Prozesscharakterisierung und Analytik

Unter Prozesscharakterisierung werden im Folgenden alle Untersuchungen verstanden, welche nicht unmittelbar im Anschluss an die Probenahme erfolgten. Zum einen handelte es sich dabei um die Ermittlung grundlegender Parameter zum Prozessverständnis, zum anderen um die aufwändigere Extraktionsschritte umfassende Probenaufarbeitung für die gaschromatographische Analyse.

2.5.1 Aufarbeitung der Proben

Auf die Anwendung herkömmlicher Methylierungsverfahren unter Zuhilfenahme von Bortrifluorid zur Analyse von Fettsäuren konnte verzichtet werden (vgl. Christie, 1992). Trotz einiger Modifikationen basiert die erarbeitete Analytik auf dem von Taube (2001) vorgestellten Prinzip.

2.5.1.1 Fließschema der Aufarbeitungsschritte

Die tiefgefrorenen Proben wurden langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der pH-Wert wurde auf $\text{pH} \geq 13$ erhöht (10 μL 2 M NaOH), um organische Säuren in die Wasserphase zu überführen. Anschließend wurden die Proben bei 20.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die klare Phase des Überstandes wurde abgezogen und 500 μL davon zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC, engl. Dissolved Organic Carbon) herangezogen (vgl. Abschnitt 2.5.1.2).

Zuletzt wurden zur Wasserphase 25 μL eines 4-Methylvaleriansäurestandards (500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in Phosphorsäure/Aceton [10:1, v:v]) gegeben. Die Konzentration der Inhaltsstoffe der Cyclohexanphase sowie der wässrigen Phase einer Probe wurden jeweils simultan am in Abschnitt 2.5.1.3 beschriebenen GC-FID-System detektiert.

Da die Anhebung des pH-Wertes bei den eventuell noch vorhandenen Zellresten Lyse verursacht (Taube, 2001) ist ein systematisch überschätzter DOC zu erwarten. Diese Überschätzung wurde aber als nicht relevant betrachtet, da die Organismen innerhalb weniger Minuten nach der Probenahme bereits Dauerstadien ausbildeten, die Weiterverarbeitung der Proben jedoch erst nach Zwischenlagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte.

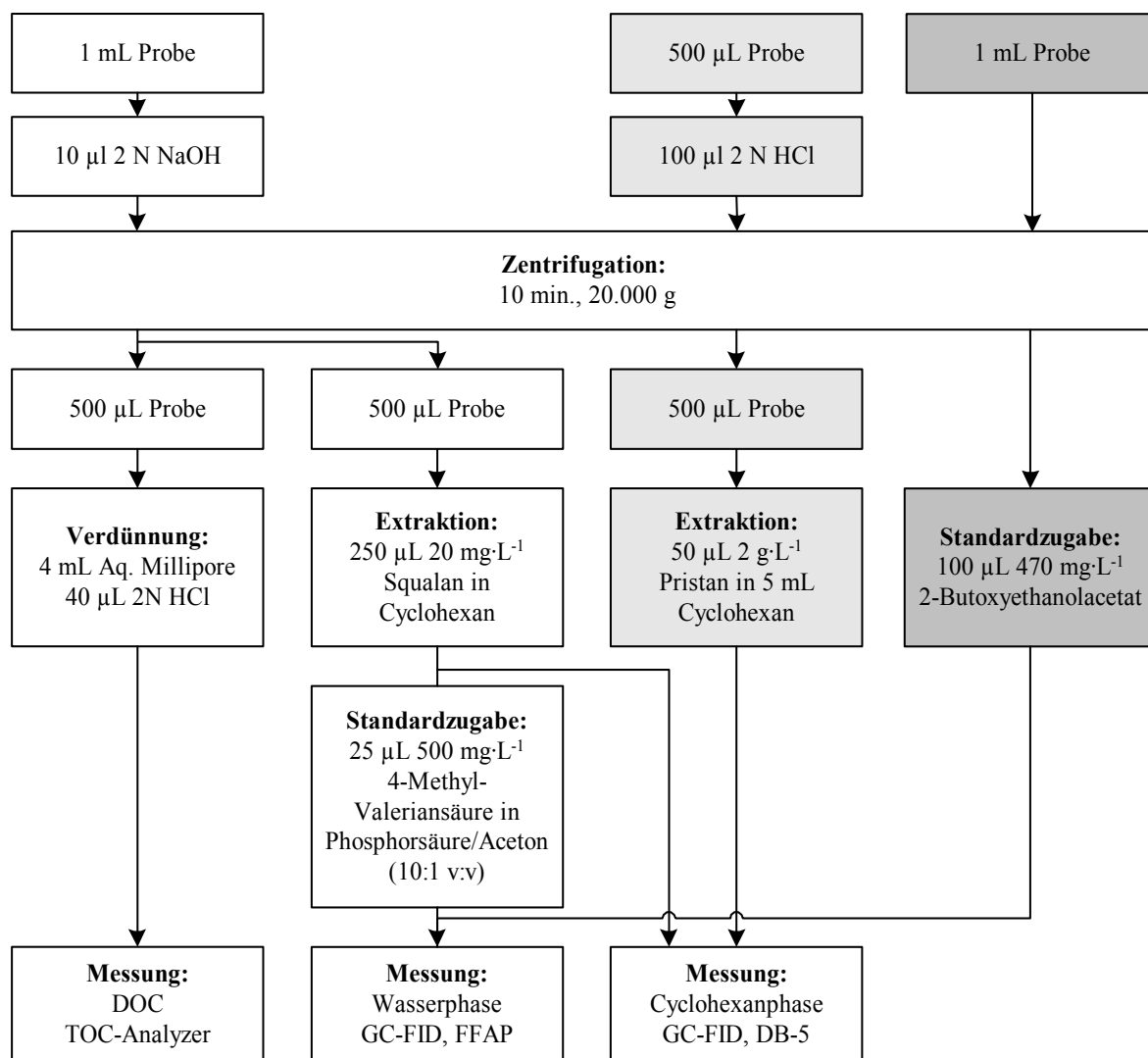


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung. Hellgrau hinterlegte Schritte stellen einen alternativen Aufarbeitungsweg für Proben aus Experimenten mit Kühlschmierstoffen dar (vgl. Abschnitt 2.3). Dunkelgrau hinterlegt ist die Aufarbeitung 2-Butoxyethanol enthaltender Proben.

Dieses Mikroextraktionsverfahren dient gleichermaßen dem Umweltschutz wie der Arbeitssicherheit, da es nur geringe Lösungsmittelvolumina erfordert. Die Effizienz derartiger Verfahren wurde u. a. von de Hemptinne (1998) bestätigt.

2.5.1.2 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs

Zur Analyse des DOC wurden 500 µL der wie in Abschnitt 2.5.1 erläutert gewonnenen Proben mit 10 mL Aqua Millipore verdünnt und nach dem Ansäuern mit 2 N HCl an einem Total Organic Carbon Analyser (TOC-5050, Shimadzu, Duisburg) in dreifacher Wiederholung gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Verdünnungen eines Kaliumhydrogenphthalat-Standards (Einwaage 2,067 g·L⁻¹, entspricht 1000 ppm bzw. 1000 mg·mL⁻¹ C) durch Erstellen dreier Eichgeraden im Bereich 0 – 150 ppm.

2.5.1.3 Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs

Die Bestimmung des CSB wurde entsprechend DIN ISO 15705 (2003) mit zertifizierten Küvettentests durchgeführt. Dazu wurde 1 mL Probe in die Reaktionslösung pipettiert und bei 148 °C 2 h in einem Thermoreaktor inkubiert. Nach Umschwenken des Küvetteninhalts erfolgte die Messung der abgekühlten Proben photometrisch bei 593 nm (komplettes Testset von Merck, Darmstadt).

Der CSB-Einleitergrenzwert für industrielle Abwässer in die öffentliche Kanalisation liegt bei etwa 1000 mg·L⁻¹. Dieser Wert wird kommunal festgelegt, so dass zum Teil auch Sonderregelungen vereinbart werden können (Zimpel, 1997). Eine Unterschreitung dieses Richtwertes unter Feldbedingungen ist für die kommerzielle Einsatzfähigkeit des entwickelten Verfahrens entscheidend.

2.5.2 Gaschromatographische Untersuchungen

2.5.2.1 Konfiguration des GC-FID-Systems

Zur Identifizierung und Quantifizierung der in das System eingebrachten Substanzen und deren Metaboliten wurden Analysen mit einem Gaschromatographen (GC), kombiniert mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Aus Tabelle 2-5 sind die Details des verwendeten Systems zu ersehen.

Tabelle 2-5: Technische Daten des verwendeten GC-FID-Systems.

<i>Komponente</i>	<i>Details</i>
Modell	Varian 3800
Autosampler	Varian 8400
Detektor	FID
Säulen	DB-5; 25 m 0,32 mm ID (Supelco, Taufkirchen) CP-Wax 58 (FFAP) CB; 50 m 0,32 mm ID (Varian, Darmstadt)
Trärgas	Helium, je 4 mL·min ⁻¹
Flamme	Wasserstoff, 30 mL·min ⁻¹ ; Synthetische Luft, 300 mL·min ⁻¹
Temperaturprogramm	4 min isotherm 32 °C; Anstieg auf 35 °C (5 K·min ⁻¹); Anstieg auf 265 °C (10 K·min ⁻¹); Anstieg auf 275 °C (20 K·min ⁻¹); 7,5 min isotherm 275 °C; Gesamtdauer: 35 min
Injektionen	Erfolgen im „Dual Mode“ Für t = 0 min auf DB-5, Injektor 1 (250 °C) Für t = 10 min (80 °C) auf FFAP, Injektor 2 (200 °C)

Die besondere Ausstattung dieses Systems ermöglichte die simultane Verwendung von zwei unterschiedlichen Säulen, welche die Analysendauer im Vergleich zur separaten Detektion

der Analyten um ca. 50 % verkürzte. Zudem konnte auf zeitaufwändige Derivatisierungen verzichtet werden (vgl. le Lacheur et al., 1993; Zaikin et al., 1999).

Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde die Cyclohexanphase mit den enthaltenen hydrophoben Analyten in den Injektor 1 auf die unpolare DB-5-Säule injiziert. Bei einer Heizrate von $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ wurden nach der ersten Injektion niedrig siedende Substanzen getrennt. Zum Zeitpunkt $t = 10$ min wurde die polare Phase mit den enthaltenen hydrophilen Komponenten in den Injektor 2 auf die polare FFAP-Säule injiziert. Beide Säulen wurden mit Hilfe eines y-förmigen Verbindungsstücks (Y-GlasSeal, Supelco, Taufkirchen) zusammengeführt, bevor sie in den Detektor mündeten, in dem zeitgleich die Detektion der Analyten erfolgte.

Jede Messung wurde zweifach wiederholt. Die Bestimmungsgrenzen lagen für die Carbonsäuren bei $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, für die MKW bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.5.2.2 GC-FID für Kühlschmierstoffe

Da die Trennung der verschiedenen Bestandteile von KSS höhere Temperaturen erforderte als die Auslegung der FFAP-Säule erlaubte, wurde das GC-System zu deren Detektion rekonfiguriert. Im Vergleich zum oben beschriebenen System wurde die Injektortemperatur auf $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Detektortemperatur auf $310 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht. Der Injektor wurde auf ein Splitverhältnis von 30 eingestellt. Das Temperaturprogramm startete bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$; es umfasste einen Anstieg auf eine Endtemperatur von $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von 25 K min^{-1} und einer isothermen Endphase bei der Maximaltemperatur von 10 min. Die Gesamtdauer des Programms belief sich auf 20 min.

Eine Konzentrationsangabe für die Komponenten der KSS A von Henkel ist nicht möglich, da es sich bei diesen nicht um Reinsubstanzen, sondern zumeist um Isomerengemische handelte. Zur Identifikation der Substanzen wurden daher mehrere Referenzpeaks herangezogen. Deren Nummerierung in chronologischer Abfolge der Elution von der Säule ist den Substratbezeichnungen zur Unterscheidung angehängt (z. B. FA 2.5).

Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung von KSS konzentrierte die qualitative Analytik sich auf deren hydrophobe Bestandteile, da diese den Hauptanteil des Gesamt-CSB ausmachen.

2.5.2.3 Messung von 2-Butoxyethanol

Die Bestimmung der Konzentration an BE erfolgte über die gaschromatographische Trennung und anschließende Detektion auf dem bereits beschriebenen GC-FID-System über die FFAP-Säule. Das Temperaturprogramm startete bei $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min isotherm), um dann mit einer

Rate von $8 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ anzusteigen (2 min isotherm), um zuletzt mit einer Rate von $50 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $240 \text{ }^{\circ}\text{C}$ anzusteigen (0,2 min isotherm).

Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard 2-Butoxyethanolacetat (BEA), da dieser Stoff in einer Untersuchung der Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1990) ein ähnliches physikochemisches Verhalten zeigt wie BE.

Nach entsprechender Verdünnung der zentrifugierten Proben wurde jeweils 1 mL in ein Vial überführt und mit $100 \text{ } \mu\text{L}$ internem Standard ($471 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) versetzt und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proben am GC-FID. Kalibrationsgeraden wurden für beide Substanzen von $10 - 60 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ aufgenommen.

2.5.3 Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration

2.5.3.1 Anionische Tenside: Leitfähigkeitsmessung

Um die CMC der anionischen Tenside SDS und SDBS zu bestimmen, wurde die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit der Tensidlösung konzentrationsabhängig bestimmt. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass die Leitfähigkeit der Lösung mit zunehmender Tensid-Monomerkonzentration steigt. Nach Erreichen der CMC nimmt die Konzentration der (nichtleitenden) Mizellen zu, die Monomerkonzentration aber bleibt konstant. Wird die gemessene Leitfähigkeit graphisch gegen die Endkonzentration in der Lösung aufgetragen, markiert ein deutlicher Knickpunkt die CMC (Kosswig und Stache, 1993, Moore und Hummel, 1986).

Reagenzien:

$0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ SDS oder SDBS in vollentsalztem Wasser

Mineralmedium M2 mit MKW-Gemisch als Kohlenstoffquelle

Durchführung:

Ein Aliquot an Mineralmedium M2 mit MKW-Gemisch als Kohlenstoffquelle wurde homogenisiert (Ultra-Turrax, TP 18/10, Janke & Kunkel KG, Staufen) und auf $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad (IKA WA, Janke & Kunkel KG, Staufen) temperiert. Unter ständiger Leitfähigkeitsmessung wurden sukzessive kleine Volumina ($10 - 50 \text{ } \mu\text{L}$) Tensidlösung zugegeben, die Lösung homogenisiert und der Messwert notiert. Die Leitfähigkeit wurde graphisch gegen die Endkonzentration des Tensids aufgetragen.

2.5.3.2 Nichtionische Tenside: Oberflächenspannungsmessung

Zur Bestimmung der CMC der nicht-ionischen Tenside wurde die konzentrationsabhängige Veränderung der Oberflächenspannung einer Tensidlösung beobachtet. Die Oberflächenspannung nimmt hierbei proportional zur Tensidkonzentration in Lösung ab. Oberhalb dieser CMC bleibt die Oberflächenspannung konstant, da die Tensidmoleküle aggregieren und somit keinen Einfluss mehr auf die Oberflächenspannung ausüben (Kosswig und Stache, 1993; Moore und Hummel, 1986).

Die Oberflächenspannungsmessung erfolgte mit Hilfe eines am Lehrstuhl für Hydrologie der Universität Bayreuth konstruierten Wilhelmy-Rings (Wilhelmy, 1863), der aus einem Ring aus rostfreiem Stahl und einer Federwaage bestand. Der Ring hatte einen Durchmesser von 0,01 m, die Federwaage war auf eine maximale Belastung von 5 g ausgelegt. Der Ring wurde in die Lösung eingetaucht und dann langsam wieder herausgezogen. Die Kraft, die im Moment des Abreißens des Wasserfilms vom Ring herrschte, war das Maß für die Oberflächenspannung. Diese berechnet sich nach folgender Formel:

$$\sigma_O = \frac{F}{2 \cdot u} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

σ_O Oberflächenspannung [N m^{-1}]
F Federkraft [N]
u Ringumfang [m].

Reagenzien:

0,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Triton X-100 oder Tergitol[®] NPX in vollentsalztem Wasser
M2 mit MKW-Gemisch als Kohlenstoffquelle

Durchführung:

Aus einem Aliquot an Mineralmedium M2 mit dem synthetischen Abwasser als Kohlenstoffquelle und der Tensid-Stammlösung wurden Tensidlösungen zunehmender Molarität von 0 - 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ vorbereitet, homogenisiert (Ultra-Turrax) und auf 65 °C im Wasserbad temperiert. Nach Temperierung und Gleichgewichtseinstellung der Lösung wurde in 9 Wiederholungen bei Abreißen des Films das Gewicht an der Federwaage auf 0,025 g genau abgelesen und notiert.

Nach Umrechnung der gemessenen Werte durch Gleichung 2-4 wurde die Oberflächenspannung graphisch gegen die Endkonzentration des Tensids aufgetragen.

2.5.4 Bestimmung der Metallgehalte der Abwässer aus der Kfz-Produktion

Zur Bestimmung der Metallgehalte der KSS aus den Werkhallen der Audi AG und der Spüllösung wurden die Proben von der Zentralen Analytik (ZA) des Bayerischen Instituts für Ökosystemforschung (BITÖK) am dort vorhandenen ICP-AES (engl. Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) ein Screening durchgeführt. Die Vorbehandlung erfolgte in Form eines sauren Mikrowellenaufschlusses nach einer modifizierten Methode des Herstellers (CEM, MDS-2100, bezogen über Waldner, Wangen i. Allgäu) zur Aufarbeitung von Abriebmetallen in Öl.

Hierzu wurde 0,5 - 1 g der KSS direkt in druckdichte PE-Mikrowellenaufschlussgefäße eingewogen und mit 10 mL einer 70 %igen HNO_3 überschichtet. Nach Zugabe eines Siedesteines und druckdichtem Verschluss der Gefäße laut Betriebsanleitung erfolgte der Aufschluss 15 min lang bei 350 Watt. Hierbei wurde der Gefäßinnendruck alle 5 min stufenweise von 1,3 bar über 2,7 bar auf 5,8 bar gesteigert. Nach dem Abkühlen und der optischen Kontrolle auf die vollständige Spaltung der Emulsion erfolgte die qualitative Überführung in 25 mL PE-Kolben. Nach dem Auffüllen bis zur Markierung mit 70 %iger HNO_3 und dem transportsicheren Verschließen der Messkolben wurden die Proben an die ZA übergeben. Zur Bestimmung von Blindwerten diente der Aufschluss von Aqua millipore Proben.

Der Screening-Modus, d. die parallele Bestimmung von 24 Elementen liefert hierbei Daten, die zwar mit einem ca. 5 %igen Fehler behaftet sind (Nash et al., 2001), aber zur Abschätzung der Belastung der Mikroorganismenkultur ausreichend sind.

3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die wesentlichen experimentellen Befunde vorgestellt, erläutert und interpretiert. Da eine Trennung der Schlussfolgerungen von den Ergebnissen oftmals nicht sinnvoll ist, werden die Resultate und Beobachtungen für jedes Unterkapitel separat diskutiert und in Kapitel 4 abschließend zusammengefasst.

3.1 Verwertbarkeit des MKW-Standardsubstrats

Vergleich der MKW-Einzelsubstanzen

Bei den Inkubationskolbenversuchen zur Abbaubarkeit verschiedener MKW stellte sich heraus, dass jede der ausgewählten Verbindungen von *Geobacillus thermoleovorans* als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann. Die qualitative Verwertbarkeit der einzelnen Substrate ist dabei nicht identisch. Im Vergleich zum Standardsubstrat Olivenöl ermöglichen insbesondere die Aromaten Toluol und 2-Methylnaphthalin vergleichbare Wachstumsleistungen.

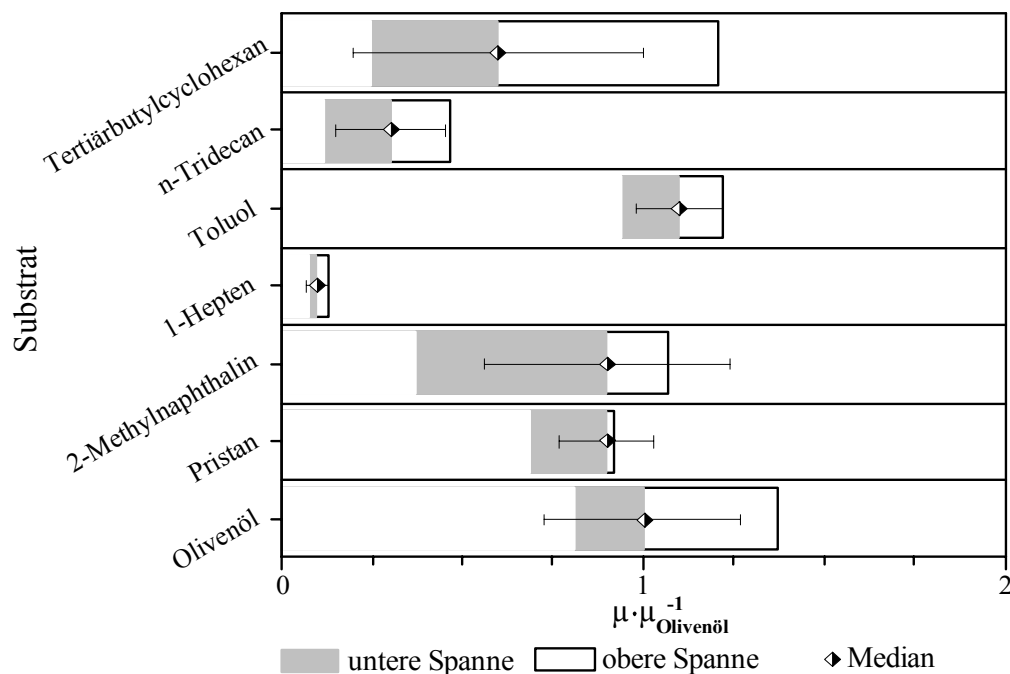


Abbildung 3-1: Ergebnisse der Inkubationskolbenversuche mit ausgewählten MKW. Dargestellt ist die Wachstumsrate μ in Relation zum Median der Wachstumsrate von *Geobacillus thermoleovorans* auf dem Standardsubstrat Olivenöl. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung σ , die breiten Balken umfassen das Spektrum der beobachteten Wachstumsraten über alle Parallelen hinweg.

Die Darstellung in Abbildung 3-1 beruht auf einem Vergleich der Wachstumsraten μ der untersuchten MKW. Bei halblogarithmischer Auftragung der Werte der OD_{610nm} bzw. der Zelldichte entspricht μ der Steigung einer an den Abschnitt exponentiellen Wachstums angepassten Regressionsgeraden.

Auf die Darstellung der absoluten Werte von μ , welche $0,03\text{ h}^{-1}$ - $0,45\text{ h}^{-1}$ betrugen, wurde verzichtet. Wie in Abschnitt 2.1.4.1 geschildert, erfolgten die Erhebung der Daten in Inkubationskolbenexperimenten. Bedingt durch den im Vergleich zu Laborfermentern geringeren O_2 -Eintrag und der bauartbedingten, für *Geobacillus thermoleovorans* suboptimalen Maximaltemperatur der Wärmehaube von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist ein direkter Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren nicht möglich.

Synthetisches Abwasser als Kohlenstoffquelle

Mit der Inbetriebnahme des autoklavierbaren Laborfermenters konnten diese Bedingungen optimiert werden. Nach dem Nachweis der prinzipiellen Verwertbarkeit der Einzelsubstanzen wurde im Folgenden das in Tabelle 2-1 beschriebene synthetische Abwasser der Kultur als Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt.

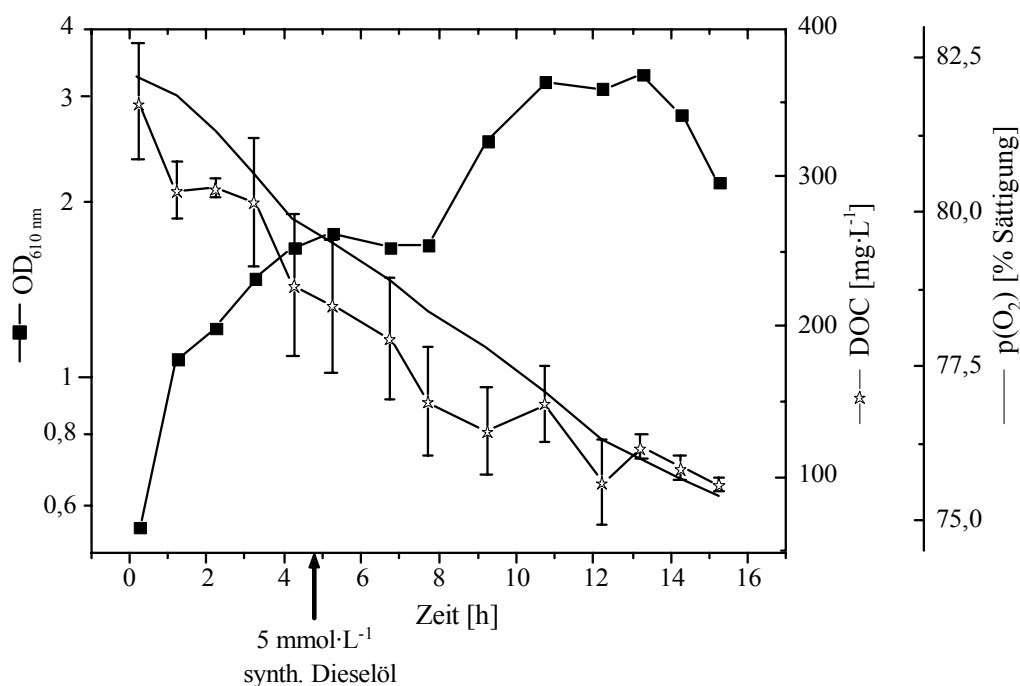


Abbildung 3-2: Batchexperiment zur Verwertbarkeit des synthetischen Abwassers als Kohlenstoffquelle. Kultivierung auf $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Olivenöl ab $t = 0$. Zugabe von $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MKW-Standardsubstrat zum Zeitpunkt $t = 4,8\text{ h}$.

Aus Abbildung 3-2 lässt sich ersehen, dass die Zugabe von $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MKW-Standardsubstrat zu einer auf Olivenöl angezogenen Batchkultur in der spätexponentiellen Phase zunächst zu einer Stagnation des Wachstums führt. Nach einer Adaptationsphase von

ca. 3 h erfolgte ein zweiter exponentieller Wachstumsschub, gefolgt von einer etwa ebenso langen Gleichgewichtsphase zwischen Zellteilung und Absterben der Zellen. Suspendierte und gelöste MKW tragen nur marginal zum Anstieg der OD bei.

Zeitlich begrenzt wurde die exponentielle Phase durch Nährstoffmangel oder die Anreicherung toxischer Metabolite im Reaktormedium (vgl. Reimann, 2003). Bei den durchgeführten Batchexperimenten lag dieser Zeitpunkt zwischen 7 und 11 h nach Zugabe des synthetischen Dieselöls.

Diskussion

Dennoch weist die trotz ununterbrochener Begasung stetige Abnahme des $p(\text{O}_2)$ auf eine ungestörte Metabolisierungstätigkeit der Kultur hin. Dass zugleich die DOC-Werte sinken, obwohl aufgrund der Substratzugabe deren Zunahme zu erwarten wäre, liegt darin begründet, dass die DOC-Messungen Auskunft über die Kohlenstoffkonzentration zum entsprechenden Zeitpunkt in der wässrigen Phase geben. In kolloidaler Form oder als Phase vorliegender Kohlenstoff soll bei korrekter Durchführung dieser Messung nicht erfasst werden.

Die Löslichkeit von MKW in Wasser ist unter Standardbedingungen gering, steigt aber mit zunehmender Temperatur (Shaw, 1989a,b) stark an. Die Bestimmung der Löslichkeiten von MKW in aquatischen Systemen erfolgte über die vergangenen Jahrzehnte hinweg weitestgehend experimentell (z. B. Marche *et al.*, 2003; May *et al.*, 1978; McAuliffe, 1966). Auf der Grundlage dieser Experimentaldaten entwickeln neuere Veröffentlichungen thermodynamische Funktionen und Modelle zur Vorhersage der Löslichkeiten von Einzelsubstanzen (Dohányosova *et al.*, 2004; Gallicchio *et al.*, 2000) oder deren Mischungen (de Hemptinne, 1998). Entscheidend für das betrachtete thermophile System ist jedoch weniger die Löslichkeit der Komponenten an sich als vielmehr deren Bioverfügbarkeit.

Es ist davon auszugehen, dass sich bei Zugabe hydrophober Substrate innerhalb des Reaktors ein Mehrphasensystem ausbildet. Dieses System ist aufgrund der stetigen Begasung als offen anzusehen. Es ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein einer suspendierten oder emulgierten hydrophoben Phase. Diese steht im Austausch mit der Lösung, der das System durchströmenden Luft sowie den Mikroorganismen. Der Entleerung des Kohlenstoffpools in Lösung durch Aufnahme in die Zellen oder Ausgasung wirkt die Rücklösung aus der hydrophoben Phase im Idealfall mit gleicher Rate entgegen.

In weiteren Versuchen (nicht gezeigt) erwies sich das synthetische Abwasser als Startsubstrat wenig geeignet. Das Wachstum der Kultur war stets unterdurchschnittlich ausgeprägt, die Extinktionen der $\text{OD}_{610\text{nm}}$ blieben stets $\leq 0,45$ und auch die Zelldichte überschritt nicht den Wert von $4 \cdot 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$. Ursache hierfür ist die Induktion der Expressierung lipolytischer

Enzyme durch Triglyceride (Amend und Shock; 2001; Becker *et al.*, 1997), eine Funktion, die von den Komponenten des artifiziellen Abwassers nicht ausgelöst wird. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Bariszlovich (1990), demzufolge Lipasen extrazellulär zur Hydrolyse der Esterbindung langkettiger aliphatischer Fettsäuren an der Öl-Wasser-Grenzfläche dienen. Erst die Reaktionsprodukte (Glycerin, freie Fettsäuren, Mono- und Diglyceride) sind membrangängig und damit energetisch nutzbar. Lee *et al.* (1999, 2001) bestätigten die Substratabhängigkeit der Lipaseproduktion für *(Geo-)Bacillus thermoleovorans* ID-1.

Sauerstoffaufnahme (OUR)

Zusätzlich wurde die Sauerstoffaufnahme (OUR) (engl. Oxygen Uptake Rate) der thermophilen Mikroorganismenkultur ermittelt (vgl. Abbildung 6-1 im Anhang). Aus einer durchschnittlichen OUR der Kultur während der stationären Phase von $1,28 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ errechnet sich ein O_2 -Bedarf der Kultur von $0,1 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einem Arbeitsvolumen von 2,5 L.

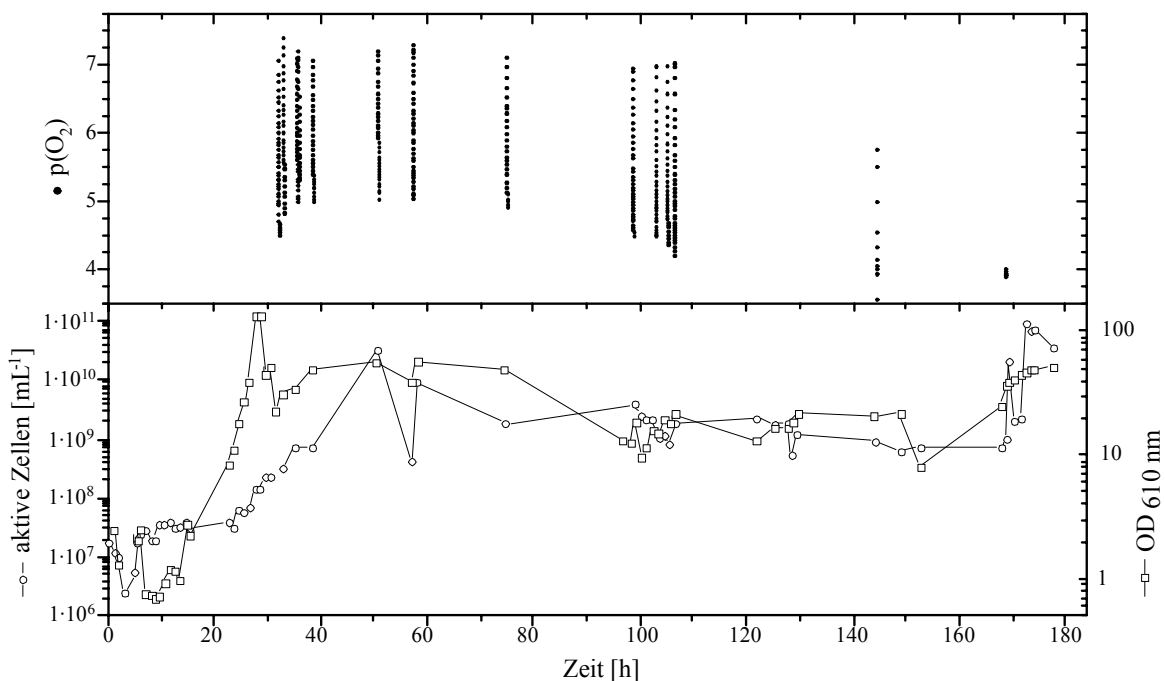


Abbildung 3-3: Ermittlung der OUR. Protokolliert wurde der Abfall von $p(\text{O}_2)$ bei Unterbrechung der O_2 -Zufuhr. Zwischen den Messreihen erfolgte konstante Begasung mit $150 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$. Batchexperiment unter Zugabe von 30 mL MKW-Standardsubstrat

Dies entspricht einer Begasungsrate mit Druckluft von 0,85 vvm. Dieser Wert würde bei optimaler Dispergierung des eingetragenen Sauerstoffs eine ausreichende Versorgung der Organismen sicherstellen. Da die Begasungsrate während mancher Experimente nicht bedarfsgerecht geregelt werden konnte, wurde diese auf $150 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ (1 vvm) eingestellt, um eine Unterversorgung der Kultur zu vermeiden.

Der Ausfall des Regelkreises wurde stets durch die Überlastung der $p(\text{O}_2)$ -Elektrode herbeigeführt, deren Funktion vorwiegend während der Experimente mit komplexen Abwässern durch deren Inhaltsstoffe beeinträchtigt wurde. Die Standdauer der Elektrode war, wie Abbildung 3-3 zeigt, auch während der Versuche mit Standardsubstraten begrenzt. Der Leistungsabfall wurde durch das Zusetzen der Membranen verursacht.

Zusammenfassung

Abschließend lässt sich feststellen, dass das MKW-Standardsubstrat die an es gestellte Mindestanforderung, nämlich als Kohlenstoffquelle für die Kultur zugänglich zu sein, erfüllt. Umgekehrt gilt dabei auch: Die thermophile Kultur war bei Kultivierung im Laborfermenter fähig, das künstliche Abwasser als Substrat zu nutzen und im Vergleich zum Standardsubstrat Olivenöl ähnliche Wachstumsraten zu erzielen (vgl. hierzu Abschnitt 3.6).

Von einer Verwendung des artifiziellen Abwassers als Startsubstrat wurde abgesehen und stattdessen die Anzucht einer funktionalen Zelldichte von mindestens $1 \cdot 10^8$ Zellen·mL⁻¹ mit Olivenöl vorgenommen.

3.2 Kultivierung unter dem Einfluss von Tensiden

Bevor die Auswirkungen der Zugabe verschiedener Tenside zur thermophilen Kultur untersucht werden konnte, wurde deren CMC unter den für das betrachtete System charakteristischen Bedingungen ermittelt. Da die Resultate der CMC-Bestimmung anschließende Experimente maßgeblich beeinflussten, werden diese zuerst vorgestellt.

3.2.1 Ergebnisse der CMC-Bestimmung

Die experimentell ermittelten CMC-Werte

Die Ergebnisse der CMC-Bestimmung der eingesetzten Tenside unterscheiden sich insbesondere bei den anionischen Tensiden erheblich von den in der Literatur angegebenen Werten. In Tabelle 3-1 sind die experimentell für das in diesem Zusammenhang relevante Milieu ermittelten Werte aufgelistet. In die Gegenüberstellung sind zudem die von verschiedenen Autoren für das jeweilige Tensid ermittelten CMC angegeben.

Tabelle 3-1: Eingesetzte Tenside und deren experimentell ermittelte CMC unter den für das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren relevanten Bedingungen (grau unterlegt) im Vergleich mit in der Literatur angegebenen Werten. Sofern Medium und Temperatur eindeutig von den Autoren angegeben wurden, sind diese vermerkt.

<i>Tensid</i>	<i>CMC</i> [mg·L ⁻¹], 65 °C, M2	<i>CMC</i> [mg·L ⁻¹]	<i>Medium, Temperatur</i>	<i>Literaturangabe</i>
Natriumlaurylsulfat (SDS)	50	144	c(CaCl ₂) = 0,021 mol·L ⁻¹ c(NaCl) = 0,03 mol·L ⁻¹	Bujan <i>et al.</i> (2001)
		1900	100 mg·L ⁻¹ PCP, 25 °C	Todd und Bielefeldt (2000)
		2400	Vollentsalztes Wasser	Todd und Bielefeldt (2000)
		300	k. A.	Thibault <i>et al.</i> (1995)
Natriumlaurylbenzolsulfonat (SDBS)	50	557 - 1045	Vollentsalztes Wasser	Bakshi <i>et al.</i> (2003)
		520	k. A.	Zhang <i>et al.</i> (1999)
		1392	k. A.	Goudar <i>et al.</i> (1999)
Triton X-100	108	43	Vollentsalztes Wasser	Guha und Jaffe (1996)
		145	Medium BSM, 30 °C	Boonchan <i>et al.</i> (1998)
		25	100 mg·L ⁻¹ PCP, 25 °C	Todd und Bielefeldt (2000)
		107	Vollentsalztes Wasser	Todd und Bielefeldt (2000)
		187	Wasser, 23 °C	Raghuraman (2004)
Tergitol® NPX	90	47	Medium BSM, 30 °C	Boonchan <i>et al.</i> (1998)
		110	k. A.	Zhang <i>et al.</i> (1999)
		37	k. A.	Laha und Luthy (1991)
		30	100 mg·L ⁻¹ PCP, 25 °C	Todd und Bielefeldt (2000)
		82	Vollentsalztes Wasser	Todd und Bielefeldt (2000)

Anhand dieser Zusammenstellung wird deutlich, wie wichtig die Bestimmung auch scheinbar bekannter Parameter in der thermophilen Verfahrensführung ist. Ein einheitliches Erklärungsmodell für die Differenzen gegenüber den bereits existierenden Literaturdaten kann hieraus allerdings nicht abgeleitet werden. Wären, wie von Kosswig (1993) beschrieben, primär Temperatur und Ionenstärke für diese Unterschiede verantwortlich, müsste die Differenz zu den Literaturangaben durchgängig erkennbar sein, da keine von anderen Autoren vorgenommene Bestimmung unter thermophilen Konditionen erfolgte.

Diskussion

Zuzutreffen scheint diese Erklärung für die Werte der CMC der anionischen Tenside SDS und SDBS, da sie um den Faktor 3 bis 48 unterhalb der Referenzwerte liegen. Für die nichtionischen Tenside Tergitol® NPX und Triton X-100 trifft dies jedoch nicht zu, weil sich deren CMC innerhalb des vorgegebenen Wertebereichs bewegen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die auffällig Abweichung nach unten für die anionischen Tenside auf Schwächen der Messmethodik zurückzuführen sind. Dem ist jedoch entgegenzusetzen, dass die Bestimmungsmessung wiederholt durchgeführt wurde. Aus Abbildung 3-4 kann man zudem ansehen, dass die Festlegung des Knickpunkts (vgl. Abschnitt 2.5.3) wenig präzise, dafür in ihrer Größenordnung eindeutig ist.

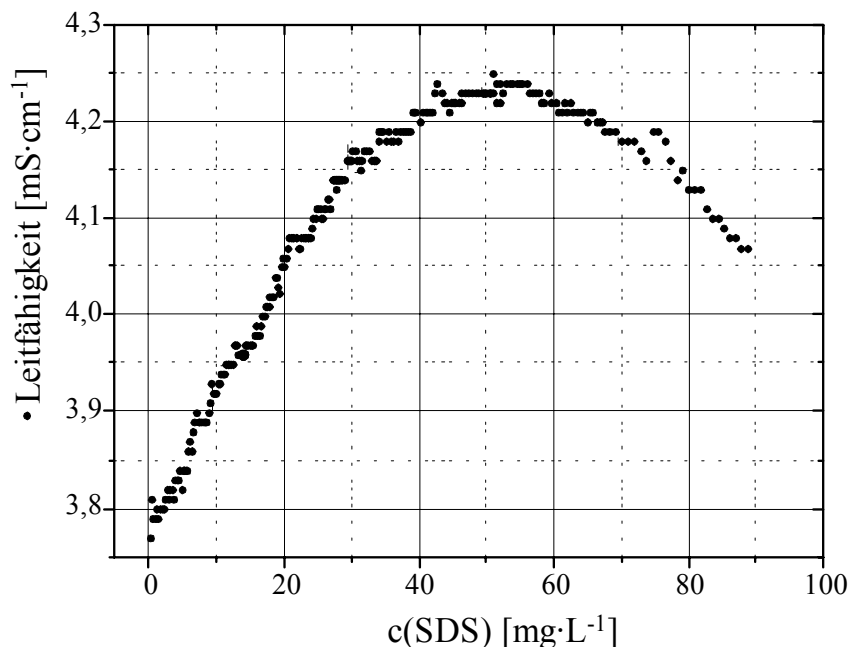


Abbildung 3-4: Bestimmung der CMC von SDS über die Leitfähigkeit. Die CMC ist der Punkt, an dem die Leitfähigkeit (sprunghaft) abnimmt (ca. 50 mg·L⁻¹).

Ein weiteres Experiment, bei dem die CMC-Bestimmung ohne Zugabe des synthetischen Abwassers durchgeführt wurde, zeigte zudem, dass diese noch erheblich niedriger, nämlich bei 20 mg·L⁻¹, lag. Im weiteren Verlauf der Experimente wurden zudem unterschiedliche Reaktionen der Kultur auf Tensidkonzentrationen unter- bzw. oberhalb der hier ermittelten CMC beobachtet. Die tabellierten Werte sind daher für das betrachtete System als zutreffend einzustufen.

Festlegung der Experimentalkonzentrationen

Ausgehend von den ermittelten Werten für die CMC wurden Werte für die einzusetzenden Konzentrationen der Tenside bestimmt. Diese Konzentrationen sollten zum einen den Einfluss der Mizellenbildung untersuchen, indem eine Konzentration unterhalb und eine Konzentration oberhalb der experimentell bestimmten CMC lag. Mit der höchsten Konzentration sollte die Belastungsgrenze des Mikroorganismus überprüft werden. Diese Konzentration wurde als die maximal mögliche unter realistischen Bedingungen angesetzt, entsprach also einer anthropogenen Überdosierung, wie sie durch fehlerhafte Handhabung von Reinigungsmitteln verursacht werden kann. Orientierung boten verschiedene Studien, die sich mit dem biologischen Abbau von Schadstoffen unter dem Einfluss von Tensiden befassten. Als wichtige Quellen sei hierzu auf die bereits in Tabelle 2-3 aufgeführten Autoren verwiesen.

Für alle weiterführenden Versuche wurden daher die einzusetzenden SDS- und SDBS-Konzentrationen auf 10, 100 und 1000 mg·L⁻¹ festgelegt. Die Konzentrationen für die Experimente mit Triton X-100 und Tergitol® NPX wurden auf 50, 500 und 2000 mg·L⁻¹ festgelegt.

3.2.2 Einfluss von SDS

Adaptation und Stimulation der Kultur

Um sicher zu stellen, dass die thermophile Kultur die Umstellung von Olivenöl auf das MKW-Standardsubstrat tatsächlich vollzogen hatte, wurde zunächst die Einstellung eines Gleichgewichts im System abgewartet.

Nach der Übergangsfrist von 7 h erfolgte die Zugabe von SDS in drei - im Diagramm durch Pfeile gekennzeichneten - Schritten. Eine erhebliche Stimulation des Wachstums der Kultur konnte nach dem ersten Zugabeschritt, in geringerem Umfang auch nach dem zweiten Zugabeschritt, beobachtet werden.

In separat durchgeführten (hier nicht gezeigten) Experimenten mit $c(\text{SDS}) = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{SDS}) = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ hatten sich die Wachstumsraten μ gleichermaßen relativ zu den vor der Tensidzugabe bestimmten verdoppelt. Im vorliegenden Fall wurde nach dem ersten Zugabeschritt eine Wachstumsrate von $\mu = 2,49 \text{ h}^{-1}$ beobachtet. Nach dem zweiten Zugabeschritt betrug μ nur noch $0,66 \text{ h}^{-1}$. Ein Grund für diese geringere Reaktion kann die Adaptation des Organismus an das Tensid sein.

Deutlich ist auch der Einfluss der Mizellenbildung auf die OD_{610nm} zu erkennen; aus deren Abnahme um eine ganze Einheit kann dementsprechend keine Aussage über das Wachstum der Kultur abgeleitet werden, weshalb im Folgenden auf deren Darstellung verzichtet wird. Positiv wirkt sich die Mizellenbildung dagegen auf die Bioverfügbarkeit des Substrats aus, was zu einer Stabilisierung der Zelldichte auf einem vergleichsweise hohen Niveau von über $3 \cdot 10^9$ Zellen \cdot mL $^{-1}$ führt.

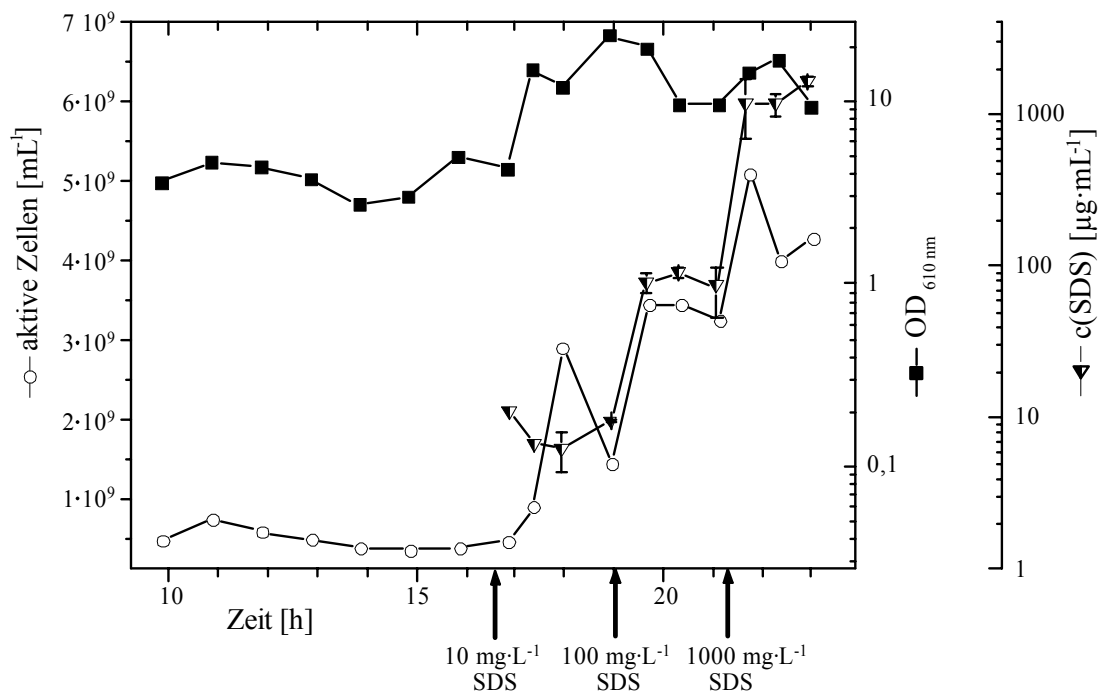


Abbildung 3-5: Einfluss der Zugabe von SDS während eines kontinuierlichen Experiments. Kultivierung auf 5 mmol·L $^{-1}$ Olivenöl. Umstellung auf kontinuierliche Zufuhr des MKW-Standardsubstrates mit einer Rate von 4,5 mL·min $^{-1}$ ab $t = 12$ h. Die Zugabe von SDS erfolgte in drei Konzentrationsschritten (10 mg·L $^{-1}$ bei $t = 16,5$ h; 100 mg·L $^{-1}$ bei $t = 19$ h und 1000 mg·L $^{-1}$ bei $t = 21,2$ h).

Diskussion

Aus der besseren Bioverfügbarkeit des Substrats nach der Zugabe von SDS lässt sich folgern, dass zuvor im Fermenter eine Substratlimitierung des Wachstums vorlag. Dass tatsächlich in diesem Fall die Verfügbarkeit von Kohlenstoff und nicht von O $_2$ der limitierende Faktor ist, bestätigt die Untersuchungen von Becker (1999) zur Kinetik des O $_2$ -Überganges unter thermophilen Bedingungen.

Für das betrachtete System konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Zugabe von SDS in Konzentrationen unterhalb und oberhalb der CMC einen Zuwachs der Löslichkeit der MKW zur Folge hat. Dass dies zu erhöhten Wachstums- und Mineralisierungsraten führt, begründen die Autoren Volkering *et al.* (1995) und Liu *et al.* (1995) mit der Beschleunigung

des Massentransfers aus der Substratphase in die wässrige Phase bzw. der verbesserten Bioverfügbarkeit solubilisierter MKW (Bury und Miller, 1993).

Unter mesophilen Bedingungen durchgeführte Studien (Boonchan *et al.*, 1998; Lupton und Marshall, 1979; Margesin und Schinner, 1998, 1999) kommen bezüglich der Toxizität von SDS auf Mikroorganismenkulturen zu äußerst unterschiedlichen und von den hier erhobenen Befunden abweichenden Ergebnissen. Eine Erklärung hierfür liefern Todd und Bielefeldt (2000) mit dem Nachweis eines reziproken Zusammenhangs zwischen Kultivations-temperatur und Inhibierungsintensität. Ursache hierfür sind die sich mit steigender Temperatur ändernden physikochemischen Eigenschaften der Lösung (Viskosität, Löslichkeiten, Diffusionskoeffizienten) sowie die gesteigerte mikrobielle Aktivität (Feitkenhauer, 1998), welche die Zellwand einzelner Mikroorganismen in intensiveren Kontakt mit den in Mizellen oder in Lösung befindlichen Substraten bringen.

Ein weiteres Erklärungsmodell speziell für *Geobacillus thermoleovorans* liefern Uma Maheswar Rao und Satyanarayana (2003). Deren Experimente hatten die Stimulation der Exkretion von α -Amylase durch Tenside zum Ziel. Dabei konnten die Autoren eine Solubilisation von Membranbestandteilen durch SDS beobachten. Hierdurch erhöhte sich die Permeabilität der Zellmembranen für das untersuchte Enzym, woraufhin dessen Konzentration in der umgebenden Lösung anstieg.

α -Amylasen dienen der Hydrolyse α -1,4-glycosidischer Bindungen, wie sie in Stärkemolekülen vorliegen (Antranikian, 1992). Obwohl im vorliegenden Fall wahrscheinlich keine α -Amylasen exprimiert werden, ist aufgrund der hier erzielten Ergebnisse von einer analogen Situation auszugehen. Deshalb lässt sich die Hypothese aufstellen, dass SDS die Membrandurchlässigkeit nicht nur selektiv für α -Amylasen erhöht, sondern auch der Transport von Oxygenasen und anderen Enzymen durch die Membran schneller erfolgt. Weil sich hierdurch die Kontaktfläche zwischen den (Mikroorganismen-)Enzymen und dem Substrat erhöht, beschleunigt die Zugabe von SDS den Abbau von MKW, verbessert die Bioverfügbarkeit der Substrate und führt daher zu hohen Zelldichten und Wachstumsraten.

Zusammenfassung

Weiterhin bleibt festzuhalten, dass SDS nicht präferentiell abgebaut wird, da die eingesetzten Konzentrationen konstant nachweisbar bleiben. Eine Anreicherung im Abfluss kann im technischen Maßstab durch die Wahl einer geeigneten Verweildauer θ wahrscheinlich vermieden werden, da unter Abwesenheit anderer Kohlenstoffquellen in Inkubations-

kolbenexperimenten ein Abbau von SDS erfolgte. Darüber hinaus stimuliert SDS in allen eingesetzten Konzentrationen nachweislich das Wachstum der Kultur.

Ein Grund hierfür kann die verbesserte Bioverfügbarkeit der Substrate durch die Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Substrat und Zellen sein. Als weiterer Grund wird vermutet, dass SDS die Permeabilität der Zellhülle für an der Oxidation von MKW beteiligte Biomoleküle erhöht. Dies führt ebenfalls zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit der Substrate.

Die aktive Zellzahl in der Einheit $[\text{mL}^{-1}]$ präsentiert sich somit als verlässlicherer Indikator zur Beurteilung der Prozesse im Fermenter als die optische Dichte.

3.2.3 Einfluss von SDBS

Stimulation des Wachstums

Unter dem Einfluss von SDBS, dem zweiten anionischen Tensid, zeigte die Kultur ein ähnliches Verhalten wie bei den Experimenten mit SDS. Bereits die Zugabe von $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDBS führte zu einer starken Stimulation des Wachstums, was sich in einer um das siebenfache beschleunigten Teilungsrate niederschlug (22 min im Vergleich zu 169 min ohne SDBS).

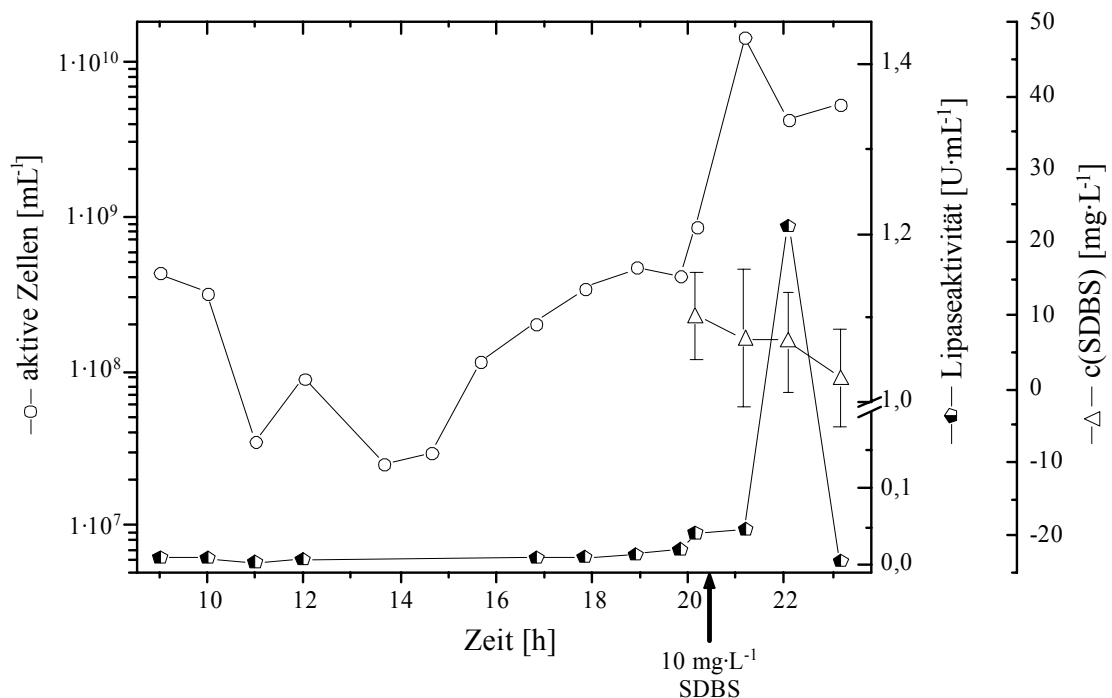


Abbildung 3-6: Einfluss der Zugabe von SDBS während eines kontinuierlichen Experiments. Zufuhr des MKW-Standardsubstrates ($4,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) ab $t = 10 \text{ h}$. Zugabe von $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDBS bei $t = 20,3 \text{ h}$.

Unmittelbar durch die SDBS-Zugabe induziert wurde zudem, wie Abbildung 3-6 zeigt, die Exprimierung von Lipase. Wie bereits in Abschnitt 3.1 diskutiert wurde, stellt die Induzierung der Lipaseexpression bei der Metabolisierung reiner MKW die Voraussetzung für eine zellstarke Verfahrensführung dar.

Metabolisierung von SDBS

Die Abnahme der Tensidkonzentrationen über die Zeit weist auf einen Abbau von SDBS durch die Kultur hin. Im in Abbildung 3-6 dargestellten Experiment mit $c(\text{SDBS}) = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ist diese Tendenz unmittelbar nach der Zugabe erkennbar. In Abbildung 3-7 erfolgt der Abbau eindeutig, nach einer Adaptationsphase von 4 h, mit einer Abbaurate $r_{\text{Abb.}} = 26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für $c(\text{SDBS}) = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Nach der Umstellung des katabolischen Enzymapparats beginnt die Metabolisierung von SDBS nach dem zweiten Zugabeschritt direkt mit $r_{\text{Abb.}} = 223 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Bemerkenswert ist, dass für $c(\text{SDBS}) = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $r_{\text{Abb.}} = 3,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ betrug, der Abbau des Tensids somit abhängig von dessen eingesetzter Ausgangskonzentration war.

Diskussion

Des Weiteren sind in Abbildung 3-7 parallel zu den Prozessüberwachungsparametern zusätzlich exemplarische Stoffwechselprodukte, d. h. eindeutig identifizierte Carbonsäuren, sowie die Konzentrationsverläufe ausgewählter MKW-Komponenten aufgetragen. Eine leichte Zunahme der Gelöstkonzentrationen beider Stoffgruppen nach dem ersten Zugabeschritt ist auch hier wieder als das direkte Resultat der Auflösung der hydrophoben Phase durch die Bildung von Mizellen zu verstehen. Die nach dem zweiten Zugabeschritt zu beobachtende Erhöhung der Konzentration gelöster Carbonsäuren ist eine Folge der abermals erhöhten Löslichkeit der Edukte. Der hierdurch induzierte beschleunigte Abbau überlastet kurzfristig die Stoffwechselkapazität der Mikroorganismen, worauf diese mit vermehrter Ausschüttung extrazellulärer Enzyme reagieren. Sobald die Überlastungsperiode nach der Anpassung der Zelldichte durch vermehrte Teilungsaktivität beendet ist, sinkt folgerichtig die Konzentration freier Säuren wieder.

Obwohl LAS unter aeroben Bedingungen als leicht und vollständig metabolisierbar gelten (Moreno *et al.*, 1998; Schöberl, 1989; Yakabe *et al.*, 1992), konnten andere Autoren (z.B. Zhang *et al.*, 1999) nicht in jedem Fall den Abbau von SDBS nachweisen. Darüber hinaus stellt die Fähigkeit von *Geobacillus thermoleovorans* in Anwesenheit von SDBS mit erhöhtem Stoffumsatz zu reagieren und sowohl das Tensid wie auch die Targetkomponenten abzubauen eine Ausnahme dar (vgl. Goudar *et al.*, 1999; Urano und Saito, 1985).

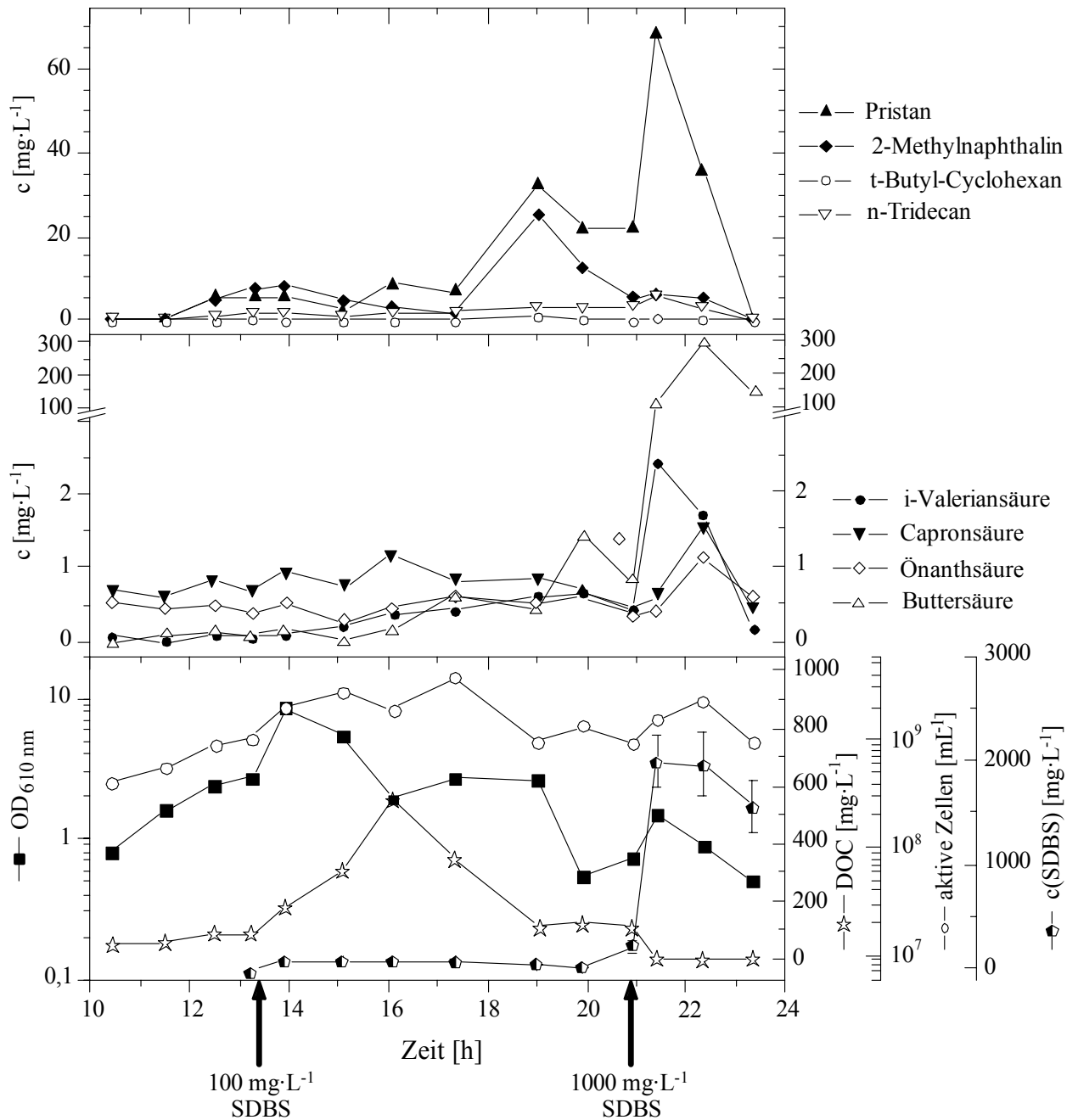


Abbildung 3-7: Einfluss der Zugabe von SDBS. Kultivierung auf 5 mmol·L⁻¹ Olivenöl. Umstellung auf kontinuierliche Zufuhr des MKW-Standardsubstrates mit einer Rate von 4,5 mL·min⁻¹ ab t = 10 h. Die Zugabe von SDBS erfolgte in zwei Konzentrationsschritten (100 mg·L⁻¹ bei t = 14,5 h; 1000 mg·L⁻¹ bei t = 20,9 h).

Zusammenfassung

Die Zugabe von SDBS führte bereits in Konzentrationen unterhalb der CMC zu einer Stimulation des mikrobiellen Wachstums ($\mu_{\max} = 1,72 \text{ h}^{-1}$). Der direkte Vergleich mit Studien anderer Autoren über den Abbau von SDBS belegt erneut die enorme Stoffwechselflexibilität des untersuchten Organismus.

3.2.4 Einfluss von Tergitol® NPX

Stimulation des Wachstums

In Konzentrationen unterhalb der CMC bewirkt die Zugabe von Tergitol® NPX zu einer mit dem synthetischen MKW-Abwasser als Kohlenstoffquelle versorgten spätexponentiellen oder statischen thermophilen Kultur eine besonders auffällige Stoffwechselstimulation.

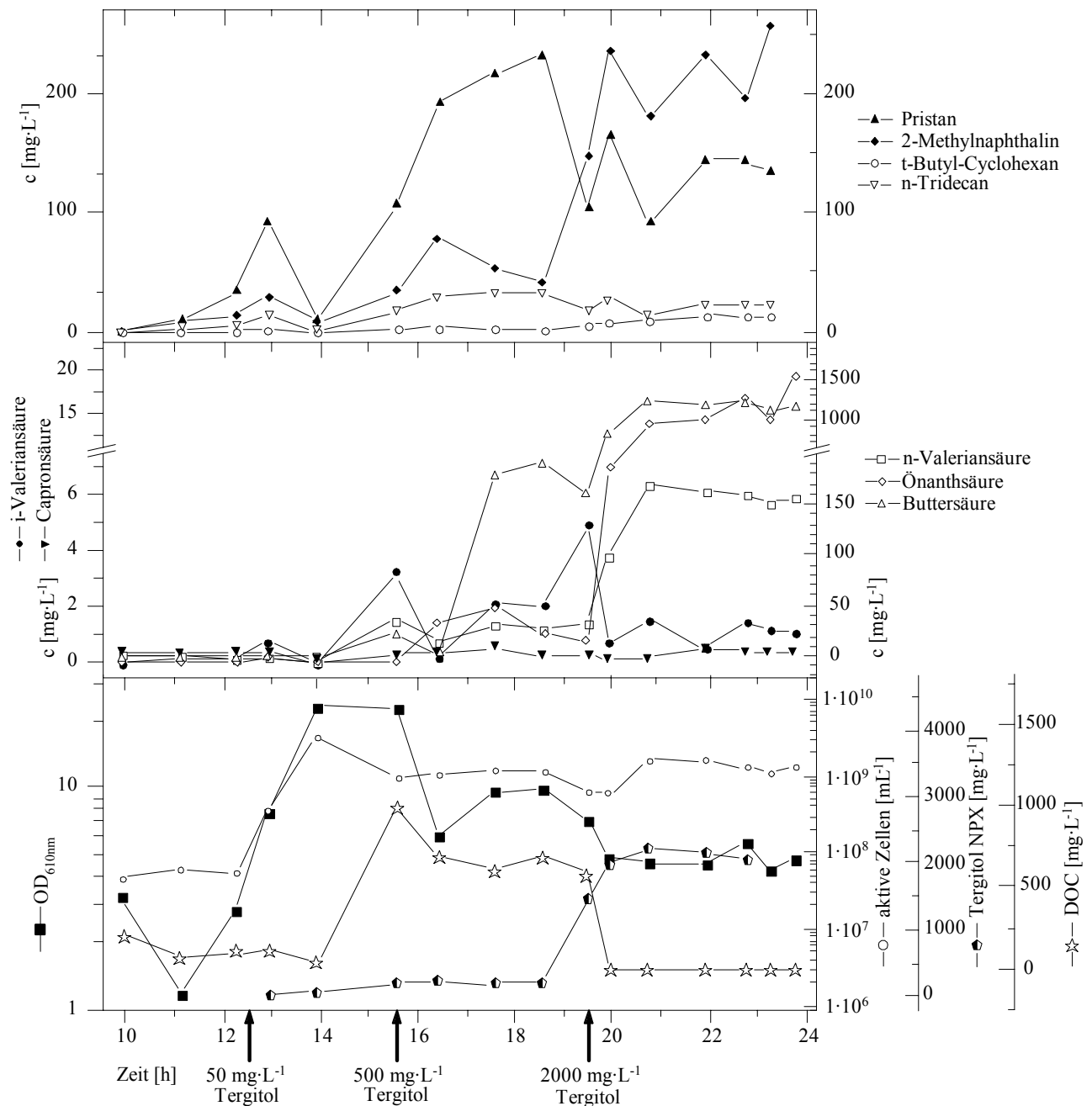


Abbildung 3-8: Einfluss der Zugabe von Tergitol® NPX. Kultivierung unter kontinuierlicher Zufuhr des MKW-Standardsubstrates (4,5 mL·min⁻¹) ab $t = 10,5$ h. Die Zugabe von Tergitol® NPX erfolgte in drei Konzentrationsschritten (50 mg·L⁻¹ bei $t = 12,4$ h, 500 mg·L⁻¹ bei $t = 15,6$ h; 2000 mg·L⁻¹ bei $t = 19,5$ h).

Hierbei konnte eine Wachstumsrate μ_{\max} von $1,25 \text{ h}^{-1}$ (aus OD) bzw. von $2,42 \text{ h}^{-1}$ (aus Zelldichte) ermittelt werden. Im Unterschied zu den anionischen Tensiden bewirkt eine Aufstockung der Tergitolkonzentration im Reaktor auf Werte oberhalb der CMC ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) keine Fortsetzung bzw. erneute Stimulation des Wachstums. Im Gegensatz dazu kann, wie in Abbildung 3-8 dargestellt, sogar eine leichte Depression der Parameter beobachtet werden.

Depression des Wachstums

Bei der Betrachtung der DOC-Kurve fällt allerdings auf, dass nur für $c(\text{Tergitol}) = 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ relativ zum Tensid freien System erhöhte Werte zu beobachten sind. Dies deckt sich mit dem aus den oberen Diagrammanteilen herauszulesenden Befund, demzufolge eine verstärkte Lösung der MKW-Komponenten und eine erhöhte Freisetzung von Stoffwechselprodukten insbesondere ab Erreichen der CMC stattfindet.

Nach Erhöhung der Tensidkonzentration auf $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kann eine schubartige Steigerung der Zelldichte ($\mu = 1,3 \text{ h}^{-1}$) beobachtet werden; auch geht diese einher mit dem schon bei Zugabe von SDBS beobachteten Phänomen der Freisetzung von Carbonsäuren. Deren Konzentration in der Lösung bleibt - im Gegensatz zu den in den Abbildungen 3-6 und 3-7 gezeigten Versuchsverläufen - in der Folge unverändert erhöht.

Diskussion

Dass zudem trotz erhöhter Konzentrationen von Edukten und (Zwischen-)Produkten in der Lösung kein DOC mehr nachgewiesen werden kann, zeigt auf, dass dieser restlos durch Stoffwechselaktivitäten der Lösung entzogen wurde. Durch die Bindung des DOC in den Tergitol-Mizellen kann die Nachlieferung bioverfügbaren Kohlenstoffs zum wachstums-limitierenden Faktor werden. Da konstant über $1\cdot 10^9 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ in der Lösung aktiv waren und weiterhin kurzkettigen Fettsäuren freigesetzt wurden, ist vom Vorhandensein einer Stoffwechselaktivität und vom weiteren Abbau des Substrates auszugehen.

Es kann anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht entschieden werden, ob die Erhöhung der Konzentration freier Fettsäuren in Lösung das Resultat der vermehrten Ausscheidung von Exoenzymen ist oder ein Ergebnis von lytischen Prozessen darstellt. Eine Diskussion dieser Faktoren erfolgt in Abschnitt 3.2.5.

Zusammenfassung

Es bleibt festzuhalten, dass die Zugabe von Tergitol® NPX unterhalb der CMC sich wachstumsfördernd auf die Kultur auswirkt. Eine Zugabe oberhalb der CMC übt keinen Einfluss auf die Kultur aus. Eine vierfache Überschreitung der CMC resultierte dagegen in

einer durch mangelhafte Substratnachlieferung bedingten Limitierung des Wachstums. Von einer Inhibierung des Wachstums kann jedoch nicht gesprochen werden.

Eine Metabolisierung von Tergitol® NPX konnte nicht beobachtet werden.

3.2.5 Einfluss von Triton X-100

Stimulation des Wachstums

Die Zugabe von $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton X-100 zur Kultur verursacht einen moderaten Wachstumsschub während dessen die Zellzahl von $6\cdot 10^8$ auf über $1\cdot 10^9$ Zellen $\cdot\text{mL}^{-1}$ ansteigt. Die zugehörige Wachstumsrate μ_{max} beträgt 0,71. Da zudem die Lipaseaktivität parallel zunimmt, kann auch für das zweite nichtionische Tensid von einer wachstumsstimulierenden Wirkung unterhalb der CMC ausgegangen werden.

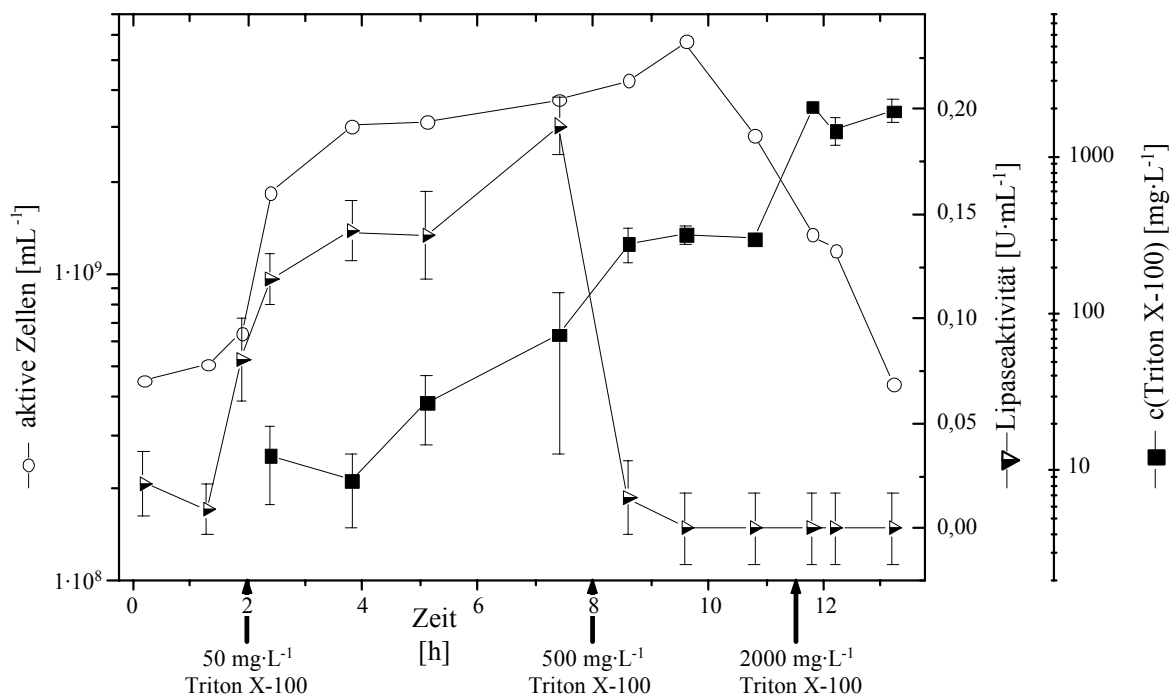


Abbildung 3-9: Einfluss der Zugabe von Triton X-100 zu einer kontinuierlichen Kultur mit MKW-Standardsubstrat ($4,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) als Kohlenstoffquelle. Die Zugabe von Triton X-100 erfolgte in drei Konzentrationsschritten ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bei $t = 2,0 \text{ h}$, $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bei $t = 8,0 \text{ h}$; $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bei $t = 11,5 \text{ h}$).

Inhibierung des Wachstums

Allerdings resultiert das Überschreiten der CMC mit dem zweiten Zugabeschritt auf $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ebenso wie im Fall des ersten nichtionischen Tensids, Tergitol® NPX, nicht in einer weiteren Wachstumsstimulation. Vielmehr ist Abbildung 3-9 ist deutlich zu entnehmen, dass diese Zugabe ursächlich für das völlige Erliegen der Lipaseaktivität ist. Auf die zentrale Rolle der Lipase auch für die Metabolisierung von MKW wurde bereits hingewiesen.

Zeitverzögert zur Inaktivierung der Lipase sinkt schließlich die Zelldichte. Eine weitere Aufstockung der Tensidkonzentration im System auf $c(\text{Triton X-100}) = 2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ beschleunigte diesen Prozess lediglich. Daher kann von einer völligen Inhibierung der Kultur durch die Anwesenheit von Triton X-100 in Konzentrationen oberhalb der CMC ausgegangen werden.

Diskussion

Laha und Luthy (1991) zufolge können verschiedene Ursachen für die Inhibierung mikrobiellen Wachstums oberhalb der CMC ausschlaggebend sein. Zum einen können toxische Effekte in Folge der Mizellenbildung auftreten. Diese können durch das Tensid oder dessen Metaboliten an sich oder durch die erhöhte Konzentration des Schadstoffes in den Mizellen verursacht werden. Nachdem MKW, insbesondere die Komponenten des synthetischen Dieselöls, auf die untersuchte Kultur keine Schadwirkungen ausüben, kann das zweite Argument als unzutreffend verworfen werden. Zumal in dieser Arbeit nachgewiesen wurde (vgl. Abschnitt 3.2.2), dass eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit der MKW wachstumsstimulierend wirkt.

Auch die Hypothese, demzufolge die Metabolisierung der MKW aufgrund der präferenziellen Nutzung der nichtionischen Tenside unterdrückt wurde (Zhang *et al.*, 1999), kann angesichts der Datenlage verworfen werden; ein Abbau von Tergitol konnte für das betrachtete System nicht beobachtet werden.

Des Weiteren kann die Inhibierung auf der erniedrigten Substratkonzentration in der wässrigen Phase beruhen, welche zu einer Substratlimitierung führt. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass in nichtionischen Tensidmizellen gebundenes Substrat im Gegensatz zu dem in anionischen Tensidmizellen für *Geobacillus thermoleovorans* nicht oder nur schwer bioverfügbar ist.

Allerdings konnten Uma Maheswar Rao und Satyanarayana (2003) keinen negativen Effekt bei der Zugabe von verschiedenen nichtionischen Tensiden zu *Geobacillus thermoleovorans*-Kulturen feststellen, die auf einem stärkehaltigen Hefeextraktmedium herangezogen worden waren. Insbesondere für die nichtionischen Tenside Tween 20, 40, 60 und 80 beobachteten die Autoren eine ebenso hohe Enzymkonzentration und eine vergleichbare Enzymaktivität in der Lösung wie bei der Zugabe von SDS. Jedoch unterdrückte Triton X-100 nach deren Angaben die Enzymsekretion. Dies entspricht den im Rahmen dieser Arbeit angestellten Beobachtungen. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen blieben die Autoren schuldig. Verschiedene andere Autoren konnten dagegen durch die Untersuchung physiologischer Wirkungsmechanismen nichtionischer Tenside Hinweise auf mögliche Ursachen geben.

Wahrscheinlich sind direkte toxische Effekte oder Interferenzen des Tensids mit Metabolisierungsprozessen des Organismus. So beobachteten z. B. Kowalczyk (1992) und Zhang *et al.* (1999) dass Tenside mit bakteriellen Proteinen und Lipiden interagieren können. Diese Wechselwirkungen konnten zu Protein- und Phospholipidsolubilisierung, Proteinfällung oder der Verbindung oder Ablösung von Protein-Untereinheiten führen, was die Hemmung von Enzymen nach sich ziehen kann.

Bisweilen kann auch die Herauslösung von Phospholipiden aus der Zellmembran zur Zerstörung der Membran und damit zur Lyse führen (Jimenez und Bartha, 1996; Laha und Luthy, 1991). Dabei dringen die nichtionischen Tenside in die Doppelschicht der Zellmembran ein, lagern sich in die Phospholipidschicht ein und verändern dadurch die Permeabilitätscharakteristik der Membran (Cserhati *et al.*, 1991). Bruheim *et al.* (1999) stellen die Hypothese auf, dass neben der Konformation der Tenside strukturelle Eigenheiten der Zellmembranen von Mikroorganismen für die Wirkung von Tensiden entscheidend sind.

Es ist daher zu vermuten, dass eben diese strukturellen Eigenheiten den Unterschied zwischen positiven und negativen Veränderungen der Membranpermeabilität bedingen. Vergleicht man die Konformation der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten von Triton X-100 mit der von SDS oder SDBS (s. Tabelle 6-3 im Anhang), erscheint die Hypothese von Bruheim *et al.* (1999) zunehmend plausibel. Es ist allerdings aufgrund der Datenlage nicht möglich zu entscheiden, ob nichtionische Tenside wie Triton X-100 die Zellmembran letal schädigen, durch die Wechselwirkung mit Enzymen zu deren Inhibierung führen oder die Produktion oder Exkretion von Enzymen verhindern.

Obwohl oben genannte Studien primär an Bodenbakterien durchgeführt wurden, ist auch das beobachtete konstant erhöhte Konzentrationsniveau freier Carbonsäuren während der vorgestellten Experimente ein Indiz für die Richtigkeit dieser Hypothesen. Die beobachteten hohen Zelldichten von mindestens $1 \cdot 10^8$ Zellen mL^{-1} sind erklärbar, sofern sich Zellwachstum (erhöhte Bioverfügbarkeit des Substrats) und Lyse (zytotoxische Wirkung des Tensids) im Gleichgewicht befanden.

Zusammenfassung

Triton X-100 bewirkt eine nicht-letale Inhibierung des Wachstums der thermophilen Kultur. Als Ursache hierfür kommen Tensid-Enzym- oder Tensid-Membran-Interaktionen oder eine Substratlimitierung durch verstärkte Bindung des Substrats in nichtionischen Tensidmizellen in Frage.

3.2.6 Einfluss der Metalle und kommerziellen Zusatzstoffe

Einfluss kommerzieller Zusatzstoffe

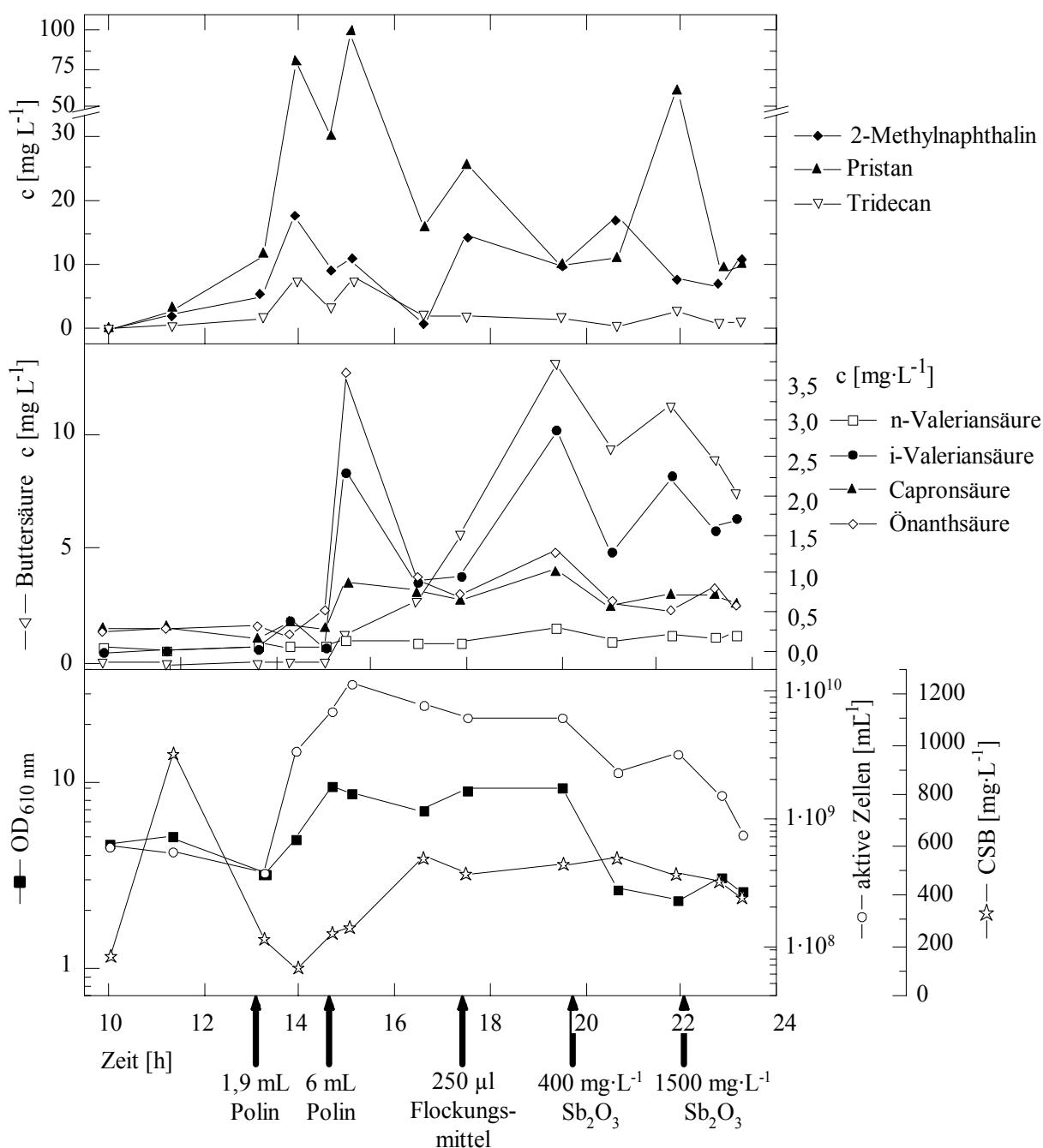


Abbildung 3-10: Einfluss der Zugabe des Shampoos „Polin“ zu einer kontinuierlichen Kultur mit MKW-Standardsubstrat (4,5 mL·min⁻¹) als Kohlenstoffquelle. Zugabe von Polin (1,9 mL für t = 13 h, 6 mL für t = 14,7 h), Flockungsmittel (250 µL für t = 17,4 h) und Antimon(III)oxid (Sb₂O₃; 400 mg·L⁻¹ für t = 19,8 h, 1500 mg·L⁻¹ für t = 22 h).

Welchen Einfluss kommerzielle Zusatzstoffe auf die Kultur bzw. die Prozessführung ausüben, kann Abbildung 3-10 entnommen werden. Nach den Resultaten der Versuche mit nicht-ionischen Tensiden stand zu erwarten, dass eine wachstumsförderliche Wirkung nur bei der Zugabe geringer Volumina des handelsüblichen Schaumshampoos „Polin“ zu beobachten

wäre. Überdies wurde vermutet, dass die laut Packungsangabe enthaltenen Bakterizide insbesondere in Kombination mit einer vierfachen Überdosierung aufgrund der in Abschnitt 3.2.5 diskutierten Ursachen ebenfalls zu einer Inhibierung der Kultur führen würden.

Bestätigt wurde statt dieser Vermutungen erneut die Adaptabilität von *Geobacillus thermoleovorans*. Beide Zugaben des Schaumshampoos begünstigten das Wachstum der Kultur. Die über beide Zugaben hinweg gemittelte Wachstumsrate μ betrug $1,78 \text{ h}^{-1}$.

Im Vergleich mit den zuvor für Zugaben von SDS und Tergitol[®] NPX unterhalb der CMC ermittelten Wachstumsraten liegt dieser Wert zwar niedriger, jedoch immer noch mehr als doppelt so hoch wie der für Triton X-100 im selben Konzentrationsbereich. Daher kann sowohl eine Inhibierung durch die unbekannten bakteriziden Bestandteile des Fabrikats als auch durch dessen nichtionische und amphotere Tensidkomponenten ausgeschlossen werden.

Diskussion

Es ist möglich, dass der wachstumsfördernde Effekt Produkt des Zufalls bzw. der Shampoorezeptur ist. Unter den unbekannten nichtionischen Tensiden befindet sich nicht Triton X-100 und wenn, dann ist dessen Verdünnung stark genug, um keine negativen Auswirkungen auf den Organismus zu zeigen. Dennoch kann das im vorigen Abschnitt diskutierte Argument, demzufolge die starke Bindung des Substrats in nichtionischen Tensidmizellen zu einer Substratlimitierung führt, aufgrund der hier angestellten Beobachtungen verworfen werden. Damit wird zugleich die Hypothese bestätigt, dass die Reaktion bestimmter Tenside mit Biomolekülen die Ursache für die in den vorigen Unterkapiteln beschriebene Suppression des Wachstums ist.

Amphotere Tenside sollten aufgrund ihrer allgemein guten Biodegradabilität kein Hindernis für die thermophile Kultur darstellen.

Insgesamt wurde eine maximale Zelldichte von über $1 \cdot 10^{10} \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ gemessen, ein Wert, der in dem für alle Untersuchungen verwendeten Laborreaktor ohne Zuschaltung der Zellrückhaltungsmodule (vgl. Abschnitt 3.4.3) nicht wieder erreicht wurde.

Einfluss des Flockungsmittels

Kein Einfluss auf die versuchsbegleitend ermittelten Wachstumsparameter konnte nach der Zugabe des Flockungsmittels zum System beobachtet werden. Erst die Auswertung der Chromatogramme zeigte das bekannte Muster, demzufolge die Konzentrationszunahme freier Fettsäuren Hinweis auf eine wachstumslimitierte Kultur ist, sofern deren Konzentration zeitnah wieder sinkt. Sobald die gleiche Zunahme in einer dauernd erhöhten Carbon säurekonzentration resultiert, ist dies als Hinweise auf eine Störung der mikrobiellen Aktivität zu werten.

Einfluss der Metalle

Für Sb(III)Oxid konnte eine starke Inhibierung des Wachstums ab einer Konzentration von $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ festgestellt werden. Zn(II)Oxid (nicht gezeigt) übt in Konzentrationen unterhalb von $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ keinen Einfluss auf die Kultur aus. Für Konzentrationen oberhalb von $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde ein leichter Rückgang der Zelldichte, jedoch keine dauerhafte Inhibierung des Wachstums beobachtet.

Einfluss von EDTA

Eine Zugabe von EDTA übte keinerlei Einfluss auf die Kultur aus. Weder wurde durch die Komplexierung von Spurenmetallen eine Inhibierung herbeigeführt, noch konnte einer durch Sb_2O_3 bedingten Inhibierung entgegengewirkt werden. Auf eine Darstellung der entsprechenden Experimentaldaten wurde daher verzichtet.

3.3 Verwertbarkeit des Kühlschmierstoffs KSS A

Nachdem in den vorigen Unterkapiteln der Einfluss genau definierter Verbindungen auf die thermophile Kultur untersucht wurde, soll nun beschrieben werden, welche Erfolge bei der Erweiterung des Substratspektrums hin zu praxisnahen Abwässern erzielt wurden. Obwohl die Inhaltsstoffe des standardisierten KSS A weitgehend bekannt sind, steigt die Komplexität der Gesamtmischung im Vergleich zu den bisher abgehandelten synthetischen Abwässern.

3.3.1 Einzelkomponenten von KSS A

Analog zu den Experimenten mit MKW wurden auch vor den Experimenten mit dem komplexen KSS Batchexperimente mit Einzelsubstanzen unternommen. Wie aus Tabelle 6-4 im Anhang entnommen werden kann, kommen für die Metabolisierung durch die thermophile Kultur insbesondere die Bestandteile mit funktioneller Zuordnung zum Feld der Schmier-

stoffe in Betracht. Diese stellen zudem den größten Volumenanteil des KSS und damit zugleich den größten Anteil am Gesamt-CSB des Gemisches.

Exemplarischer Wachstumsverlauf

Aufgrund bisheriger Untersuchungen konnte davon ausgegangen werden, dass die Mineralöl-basiskomponente MOP, die Fettsäure-Triglyceride FSR (vgl. Becker, 1999) sowie die Fettsäure FS 2 (lineare, gesättigte Fettsäure, als Abbauprodukt von Tridecan nachgewiesen) problemlos verwertbar sind. Deshalb konzentrierten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf die übrigen Fettsäuren und Fettalkoholalkoxylate. Die zur Bezeichnung der Einzelkomponenten verwendeten Abkürzungen sind ebenso wie die Rezeptur von KSS A in Tabelle 6-4 im Anhang zusammengefasst.

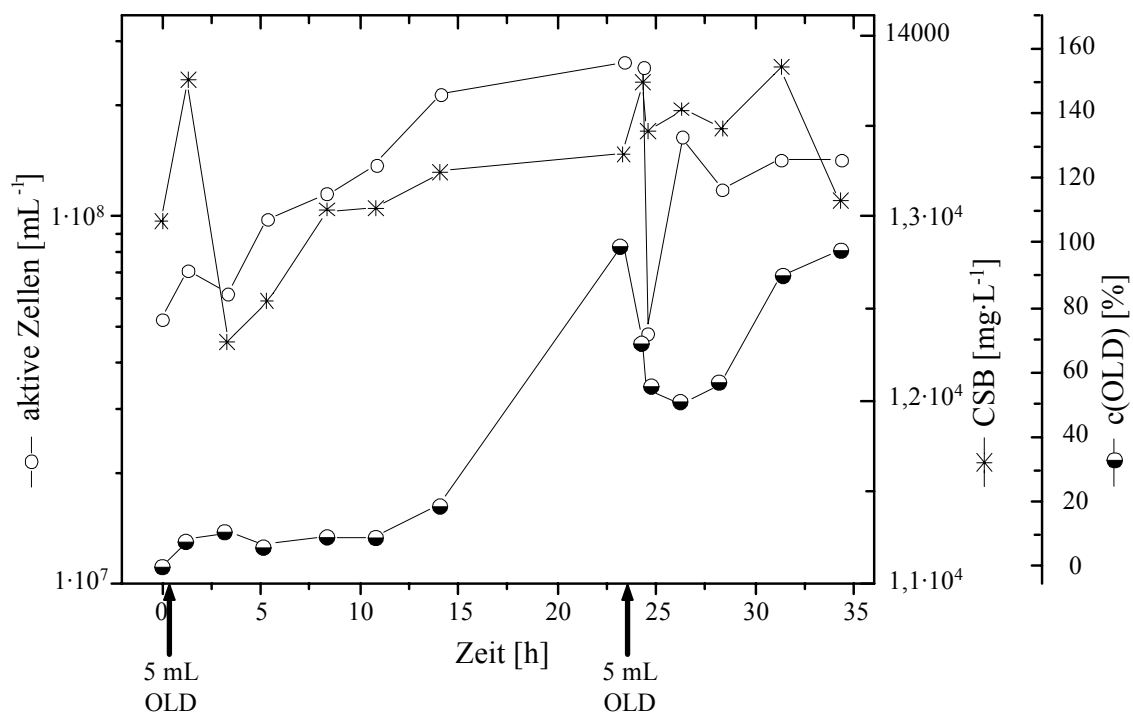


Abbildung 3-11: Batchexperiment zur Verwertbarkeit der KSS-Komponente OLD durch die thermophile Kultur. Adaptation an das Substrat erfolgte 10 h vor Versuchsbeginn durch Zugabe von 10 mL OLD. Zugabe von je 5 mL OLD bei $t = 0,3$ h und $t = 23,3$ h.

Abbildung 3-11 zeigt exemplarisch den Verlauf eines Batchexperiments zur Verwertbarkeit der Ölsäurederivatkomponente OLD. Eine lag-Phase ist im gezeigten Versuchsverlauf nicht zu beobachten, da 10 h vor Beginn der Aufzeichnungen bereits 10 mL der Substanz zugegeben worden waren. Unmittelbar nach Substratzugabe zum Zeitpunkt $t = 0,3$ h setzt daher die exponentielle Wachstumsphase mit $\mu = 0,77$ ein. Bis zur Plateauphase wird die vergleichsweise bescheidene Zelldichte von $1,5 \cdot 10^8$ Zellen·mL⁻¹ erreicht. Es fällt auf, dass noch vor dem zweiten Zugabeschritt die Konzentration von OLD in der Lösung stark ansteigt.

Zuvor hatte sich offensichtlich ein Gleichgewicht zwischen der Zulieferung aus der Phase und dem Abbau des Substrats bei etwa $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ eingestellt.

Diskussion

Ursache hierfür könnte die Bildung oberflächenaktiver Substanzen sein. Diese Hypothese stützt sich u. a. auf die Feststellung von Ron und Rosenberg (2002), demzufolge Bioemulgatoren vorzugsweise während der Plateauphase gebildet werden. Die fraglichen Verbindungen können sowohl niedermolekular als auch hochpolymer sein. Kurzkettige Verbindungen würden dazu beitragen die Oberflächenspannung zu vermindern; eine, wie schon bei den Untersuchungen zum Einfluss von Tensiden gezeigt werden konnte, hocheffiziente Methode zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit der Substrate (vgl. Abschnitt 3.2; Vipulanandan und Ren, 2000). In die Zellwände eingelagerte Polymere erhöhen dagegen die Bindungskraft der Zelloberflächen für hydrophobe Substanzen (Rosenberg *et al.*, 1992, Stucki und Alexander, 1987).

Dagegen spricht jedoch, dass die Fähigkeit von *Geobacillus thermoleovorans* zur Synthetisierung von Bioemulgatoren oder zur eigenständigen Zellwandmodifikation weder von anderen mit diesem Organismus befassten Autoren nachgewiesen wurde (Annweiler *et al.*, 2000; Feitkenhauer *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001a,c; Lee *et al.*, 1999, 2001; Markossian *et al.*, 2000; Milo *et al.*, 1999; Nazina *et al.*, 2001; Novotny und Perry, 1992; Reimann, 2003; Uma Maheswar Rao und Satyanarayana, 2003; Zarilla und Perry, 1987), noch die in diesem Projekt erhobenen Daten und in der vorliegenden Arbeit geschilderten Experimente Anhaltspunkte zur Untermauerung dieser Hypothese geben.

Zur Klärung dieser Frage besteht deshalb weiterhin Forschungsbedarf. Da Sprünge in der Konzentration in der Lösung auch für die Komponenten FA 1, FA 2 und FS 2 bzw. deren Einzelpeaks im Chromatogramm zwischen 8 h und 11 h nach Versuchsbeginn beobachtet wurden, kann jedoch von einem systematischen Zusammenhang ausgegangen werden.

Zweiter Zugabeschritt

Nach dem zweiten Zugabeschritt brechen sowohl die Zelldichte als auch $c(\text{OLD})$ deutlich ein. Der Wiederanstieg auf vormalige Werte erfolgt für OLD nach etwa 11 h; der Zelldichtezuwachs erfolgt schneller, aber nicht mehr vollständig. Der Prozess, der diesen Beobachtungen zu Grunde liegt, ist offensichtlich die Überschreitung der CMC für OLD. Dies führt, wie schon zuvor erläutert, zu schlagartig erniedrigter Bioverfügbarkeit des Substrats und damit zu durch Substratmangel ausgelöster Zytolyse. Da die Gesamt-

konzentration von Ölsäure im System unter $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ beträgt, ist die von Becker (1999) beschriebene Kinetik der Ölsäurehemmung in diesem Kontext irrelevant.

Die Fettsäuren FS 1 und FS 2 waren für die Kultur nicht gut verwertbar, was sich in geringen Zelldichten ($2,8 \cdot 10^8$ bzw. $2 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$) niederschlug. Ergänzend hierzu wird auf die Resultate der kontinuierlichen Experimente in Abschnitt 3.3.2 verwiesen.

3.3.2 Verwertbarkeit von KSS A

Der vom Hersteller empfohlene 5 %-Ansatz des KSS A-Konzentrats in Wasser entspricht einem CSB von $1 \cdot 10^7 \text{ mg L}^{-1}$. Da diese Belastung für aerobe Verfahren untypisch hoch ist, wurde durch die Variation der Verdünnung die Maximalbelastung des Verfahrens ermittelt.

Ansatz 1 %

Zunächst finden sich hier die Ergebnisse eines semikontinuierlichen Experiments in Abbildung 3-12 dargestellt. Die Zelldichte, mit $7 \cdot 10^8$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ relativ gering, sinkt nach Beendigung der Substratzufuhr auf ca. $2,5 \cdot 10^8$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$. Dass anschließend die Metabolisierungstätigkeit über mehr als 100 h hinweg andauerte, zeigt einerseits, dass KSS A durch die thermophile Kultur verwertbar ist. Andererseits zeigt sich darin auch, dass das technische Gemisch auch in starker Verdünnung schwer metabolisierbare Bestandteile enthält, zu deren Abbau eine längere Verweilzeit notwendig ist.

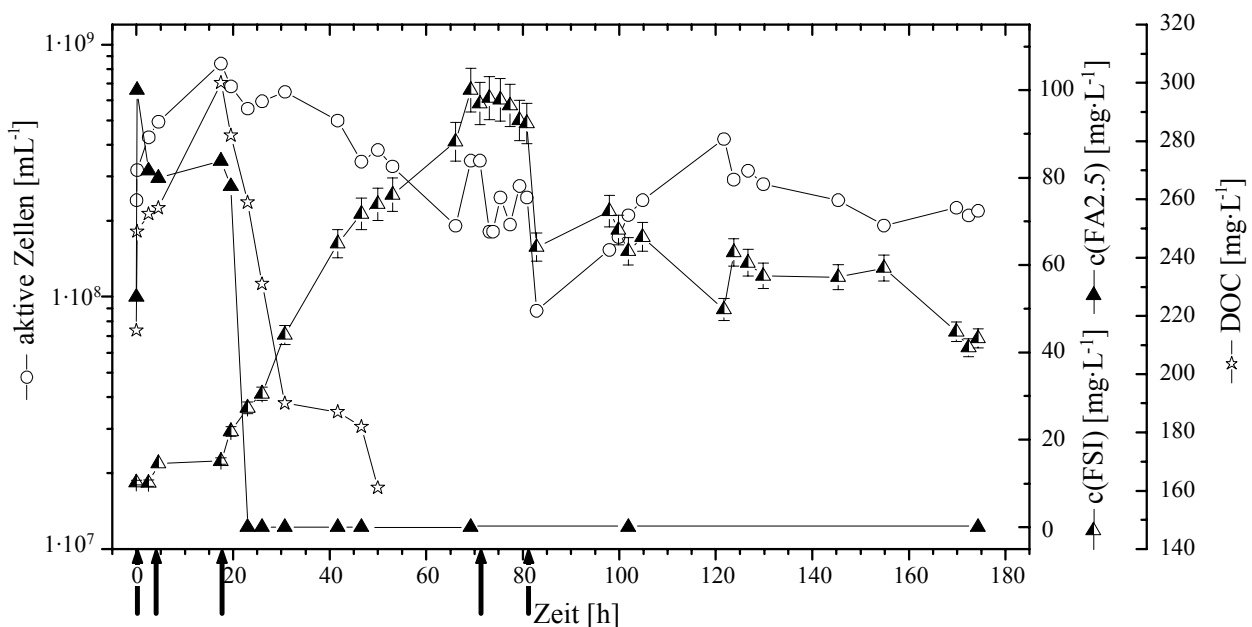


Abbildung 3-12: Semikontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit von auf 1 % verdünntem KSS A. Zufuhr von 2000 mgL^{-1} KSS A für die Zeitintervalle $[0,03 \text{ h}; 4,6 \text{ h}]$ und $[17,7 \text{ h}; 71,3 \text{ h}]$. Bei $t = 81 \text{ h}$ Austausch von $0,5 \text{ L}$ Reaktormedium. $\theta = 42 \text{ h}$ für kontinuierlichen Experimentalbetrieb.

Darüber hinaus wird demonstriert, dass die Inhaltsstoffe des KSS A einer Abbausequenz unterliegen, welche von den Präferenzen des Organismus bestimmt wird. Die Substanz FA 2 - symbolisiert durch Teilpeak 5 - ist im Reaktor nur anfänglich nachweisbar. Innerhalb von 3 h sinkt die Konzentration trotz weiterer Substratzufuhr auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze ab und bleibt im weiteren Experimentverlauf nicht detektierbar. Dennoch ist auch FA 2.5 nicht das am schnellsten metabolisierbare Substrat.

Tabelle 3-2: Abbausequenz ausgewählter Bestandteile der KSS A

<i>Substanz</i>	<i>Feed</i> t = 0 h	<i>Reaktor</i> t = 0 h	<i>Reaktor</i> t = 20 h	<i>Reaktor</i> t = 40 h
FS 1	+	+	+	+
OLD	+	-	-	-
FA 2.5	+	+	+	-
FA 2.7	+	-	-	-
FA 2.10	+	-	-	-
FA 2.11	+	-	-	-
FA 2.14	+	-	-	-

Noch schneller und damit präferenziell abgebaut werden, wie Tabelle 3-2 verdeutlicht, OLD sowie weitere Bestandteile des Fettalkohol-Isomerengemischs, welches unter der Bezeichnung FA 2 zusammengefasst ist. Im Gegensatz hierzu akkumuliert FS 1, während die Substratzufuhr andauert, stetig in der Lösung. Dennoch ist auch hier ab t = 72 h ein langsamer Abbau festzustellen. Bereinigt um das zum Zeitpunkt t = 81 h ausgetauschte Flüssigkeitsvolumen wurde ein Abbau von FS 1 um 19,2 % innerhalb von 90 h beobachtet.

Diskussion

Der mit FA 3 bezeichnete Emulgator wirkt auch wie ein nichtionisches Tensid. Darüber hinaus enthält KSS A zu einem geringen Prozentsatz Polyglycole (PAG; vgl. Tabelle 6-4 im Anhang). Polyethylenglykole sind ebenfalls schwache, nichtionische Tenside, von denen bekannt ist, dass sie die Permeabilität von Zellmembranen erhöhen (Arnold *et al.*, 1985).

Sofern diese beiden Substanzen ähnliche Wirkungen auf die Kultur ausüben wie die Tenside Tergitol NPX[®] oder Triton X-100, dürfte es sich aufgrund der starken Verdünnung des KSS um wachstumsstimulierende Effekte handeln, da alle Tenside unterhalb der CMC die Wachstumsparameter der Kultur positiv beeinflussen (vgl. Abschnitt 3.2).

Spekulativ bleibt, ob dieser hypothetisch positive Effekt der Tenside durch die Schädigung der im KSS enthaltenen Bakterizide kompensiert wird. Aufgrund der Komplexität des

Substrates sind weitere Schlüsse hinsichtlich der spezifischen Wirkung einzelner Komponenten nicht möglich.

Die nachrangige Verwertung von FS 1 ist als Folge der sterischen Hinderung des β -Oxidationsmechanismus durch die Blockade des β -Kohlenstoffatoms durch eine Methylgruppe zu sehen (Schaeffer *et al.*, 1979). Da trotz ähnlicher (anteiso) Struktur auch ein Abbau von Pristan (2,4,12,14-Tetramethylpentadecan, vgl. Abschnitt 3.1) möglich ist, kann daraus geschlossen werden, dass *Geobacillus thermoleovorans* alternative Abbaupfade zur Alkan- bzw. zur Fettsäureoxidation nutzen kann.

Ansatz 5 ‰

Obwohl aus den bisherigen Experimenten klar hervorgegangen war, dass eine vollständige Reinigung KSS belasteter Abwässer innerhalb kurzer Verweildauern nicht zu erwarten ist, wurden die Versuche fortgesetzt.

Abbildung 3-13 zeigt ein Experiment, bei dem eine starke Überlastung des Verfahrens simuliert wurde. Die Zulaufkonzentration betrug zunächst 10 ‰, was einer Raumlast von $20 \text{ kg O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ entspricht. Unter diesen Voraussetzungen akkumulieren jedoch nicht nur die schwerer abbaubaren Komponenten, sondern auch die leicht abbaubaren Fettalkoholethoxylate.

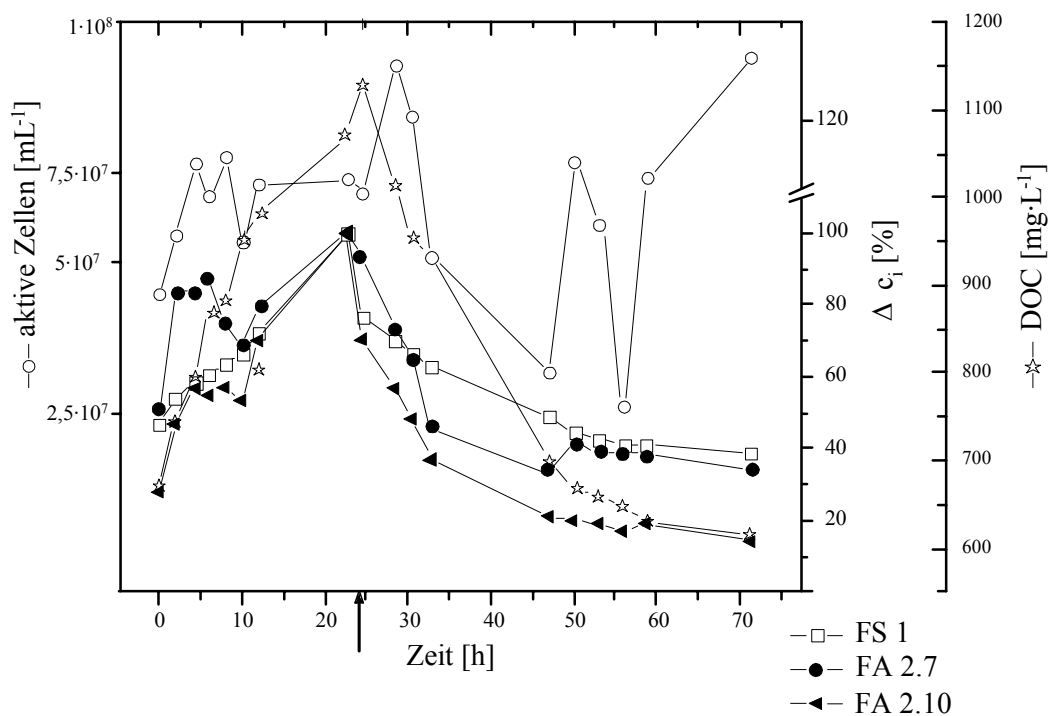


Abbildung 3-13: Variation der Zulaufkonzentration. Kontinuierliches Experiment mit $c(\text{KSS A}) = 10 \text{ ‰}$ für $t \leq 24,5 \text{ h}$ bzw. $c(\text{KSS A}) = 5 \text{ ‰}$ für $t > 24,5 \text{ h}$ (Pfeil). $\theta = 12 \text{ h}$.

Erst nach der Umstellung der Zulaufkonzentration auf 5 ‰ kann ein Abbau für alle Substratbestandteile beobachtet werden. Abzüglich der Verdünnung durch den Überlauf wurde für

alle Substanzen außer FS 1 ein Abbaugrad zwischen 72 % und 89 % ermittelt, wobei FA 2.10 regelmäßig präferenziell und FS 1 am langsamsten metabolisiert wurde.

Somit konnte festgestellt werden, dass KSS A in der ab Werk empfohlenen Dosierung bei einer Verweilzeit von 8 h zum großen Teil von der thermophilen Mikroorganismenkultur verwertbar ist. Da für aerobe Verfahren Verweilzeiten von 6 - 40 h gebräuchlich sind (Geerdink *et al.*, 1996), wurden in weiteren Experimenten die Verweilzeiten schrittweise verlängert. Im Labormaßstab erwies sich hierbei $\theta = 12$ h als besonders geeignet. Als Ausgangspunkt für die Pilotanlagenversuche mit KSS A wurde daher dieser Wert festgelegt.

Zusammenfassung

Bei der Verwertung von KSS im thermophilen aeroben Ansatz ist die Bereitstellung von Anmischwasser unumgänglich. Die Verweildauer komplexer Abwässer ist höher anzusetzen als die einfacherer MKW-Mischungen. Die Wirkungen einzelner Komponenten können aufgrund der Komplexität der Rezepturen nur schwer abgeschätzt werden.

Die Metabolisierung der Komponenten folgt einer Kaskade. Als Folge akkumulieren Einzelsubstanzen wie FS 1 und theoretisch auch Bakterizide in der Lösung. Es wird die Existenz eines zur β -Oxidation alternativen Alkan- und Fettsäureoxidationsmechanismus postuliert.

3.4 Verwertbarkeit von Abwässern aus der Kfz-Produktion

Die KSS aus der Kfz-Produktion wurden verschiedenen Produktionsanlagen der Audi AG (Ingolstadt) entnommen. Aufgrund des im Vergleich zu KSS A erneut gesteigerten Komplexitätsgrades der Zusammensetzung der Schmierstoffe wurde zunächst eine Charakterisierung der Abwässer vorgenommen. In den anschließenden Bioreaktorexperimenten wurde deren Verwertbarkeit durch die thermophile Kultur untersucht.

3.4.1 Ergebnisse der Abwassercharakterisierung

CSB und DOC

Obwohl eine detaillierte Aufstellung der Basiszusammensetzung der KSS und Abwässer von Seiten der Audi AG zur Verfügung gestellt wurde, waren einige zur Durchführung von Laborfermenter-Experimenten notwendige Parameter unbekannt. Daher wurden zunächst die Summenparameter CSB und DOC bestimmt. Die Daten wurden verwendet, um den CSB des Zulaufs auf Konzentrationen innerhalb der bekannten Belastungsgrenzen der thermophilen Kultur einzustellen.

Aufgrund der hohen CSB-Gehalte, die, wie in Tabelle 3-3 aufgelistet, zwischen 80.500 und 540.000 mg·L⁻¹ lagen, ist die aerobe Verfahrensführung nur bei Verdünnung des Ausgangsmaterials möglich. Für die Batchexperimente wurde daher das Zugabevolumen so berechnet, dass ein CSB im Reaktorgefäß zwischen 5.000 und 10.000 mg·L⁻¹ resultierte. Für kontinuierliche Experimente wurde der Vorlagebehälter mit den auf 10.000 mg·L⁻¹ verdünnten Lösungen bestückt und die Raumbelastung über die Zulauftrate, d. h. hydraulische Aufenthaltszeit θ reguliert.

Tabelle 3-3: Ergebnisse der Charakterisierung der KSS aus der Kfz-Produktion.

Anlage	CSB [mg·L ⁻¹]	DOC [mg·L ⁻¹]
Aluminiumbearbeitung	187.200	50.200
Laugenmischemulsion	80.500	25.400
Graugussbearbeitung	304.600	104.500
Lackiererei, ungefällt	540.000	53.700
Lackiererei, gefällt	211.000	n.b.

Da durch die Oxidationsmethodik des CSB auch nicht biologisch oxidierbare Lösungsbestandteile, insbesondere Metalle, mit erfasst werden, sollte der DOC einen Hinweis auf den Anteil biodegradierbarer Substanz liefern. Auf die Ermittlung des BSB wurde verzichtet, da bei normgerechter Anwendung der Methodik (vgl. DIN EN 1899-1, 1998; DIN EN 1899-2, 1998) keine sinnvollen Daten zu erwarten waren. Animpfmateriel der örtlichen Abwasserreinigungsanlage zu verwenden schied aufgrund der in den Probelösungen enthaltenen Bakterizide von vornherein aus. Die als Variante vorgeschlagene Methode, an die Inhaltsstoffe der Probe adaptiertes Impfmateriel zu verwenden, scheiterte an der vorgeschriebenen Inkubationstemperatur von 20 °C, da *Geobacillus thermoleovorans* unterhalb 40 °C Dauerstadien ausbildet (Becker, 1999).

Wie bedeutsam biologisch nicht oxidierbare Substanzen für den Gesamt-CSB sind, zeigt sich im Vergleich der CSB-Werte der Lackiererei-Spüllösungen. Durch die Fällung wurden 61 % des CSB entfernt.

Für die Spüllösung wurde auch der Gehalt an 2-Butoxyethanol (BE) im gefällten Abwasser durch Messung am GC-FID bestimmt. Der Gehalt an BE beträgt in der gefällten Spüllösung 83,2 g·L⁻¹.

Weitere Angaben

Für alle KSS wurden Chromatogramme der hydrophoben Bestandteile aufgenommen. Die Komplexität der Abwässer, allen voran die der KSS zur Aluminiumbearbeitung, ist hier (Abbildung 3-14) exemplarisch veranschaulicht.

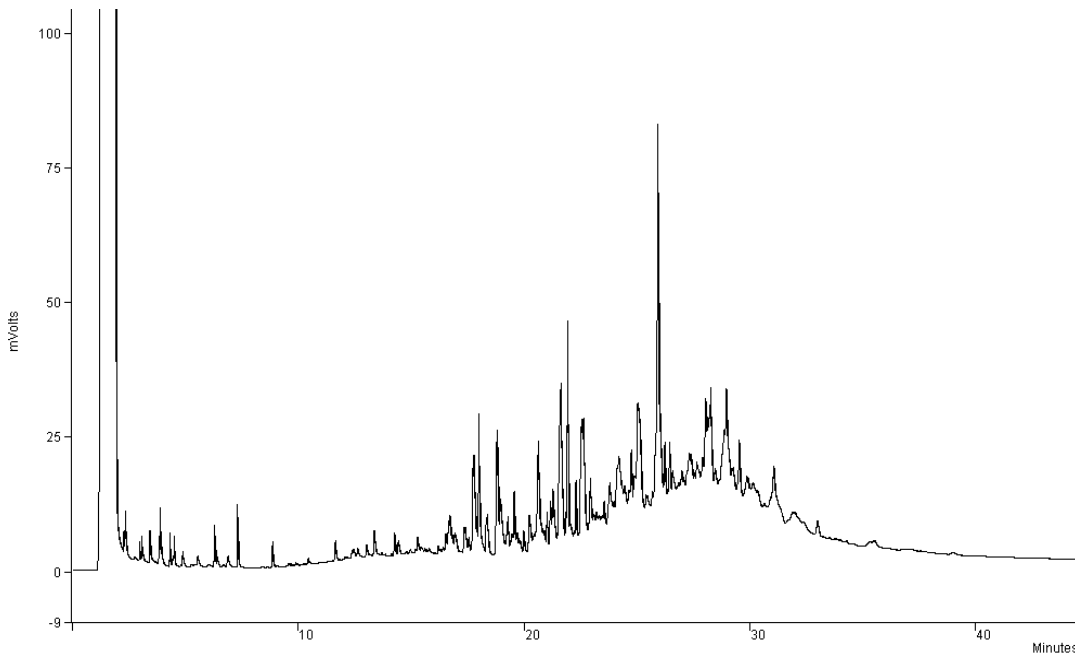


Abbildung 3-14: GC-Chromatogramm der Kühlschmieremulsion zur Aluminiumbearbeitung

Für natürliche Ölprodukte typisch ist die Aufwölbung der Basislinie, auch bekannt als UCM (engl. Unresolved Complex Mixture). Sie indiziert das Vorhandensein einer Vielzahl an niedrigprozentual vertretenen isomeren Kohlenstoffverbindungen. Eine gaschromatographische Trennung der UCM erfordert hohen apparativen Aufwand (Bundt *et al.*, 1991; Killops und Al-Juboori, 1990; Pál *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994a,b). Da das Ziel der vorliegenden Arbeit nicht die gezielte Auftrennung und Identifizierung von Einzelkomponenten eines bestimmten KSS, sondern die Untersuchung der Verwertbarkeit exemplarischer MKW enthaltender Abwässer war, wurde darauf verzichtet. Dennoch konnte festgestellt werden, dass der KSS aus der Anlage zur Aluminiumbearbeitung überwiegend aus langkettigen Alkoholen, Aldehyden und Säuren zusammengesetzt ist. Dagegen enthält der KSS zur Graugussbearbeitung weniger oxidierte Verbindungen, das heißt kaum Aldehyde und Säuren, dafür mehr Alkane und Alkohole.

Metallgehalte

Die in den KSS aus der Kfz-Produktion enthaltenen Metalle und deren Konzentrationen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Insbesondere bei der Laugenmischemulsion fällt der hohe

Ca-Gehalt auf, von dem jedoch kein negativer Einfluss auf den Mikroorganismus zu erwarten ist. Auch ist anzunehmen, dass die gemessenen Gehalte an Cu oder Pb nur zum Teil als ionisierte Spezies in der Lösung vorliegen. Wenn doch, ist ihre Herkunft auf u. U. auf in internationalen Zulieferbetrieben gebräuchliche Oberflächenbehandlungen von Blechen und Legierungen zurückzuführen (mündl. Mitteilung Robien, 2002).

Tabelle 3-4: Ergebnisse des Screenings auf Metallgehalte in den Audi-Abwässern. Werte gerundet. As, Cd, Co, Cr, Li, Ni, Mo, Sb, Se und Sn wurden in keinem Fall oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen.

<i>Element</i>	<i>Aluminium- bearbeitung [mg·L⁻¹]</i>	<i>Laugenmisch- emulsion [mg·L⁻¹]</i>	<i>Grauguss- bearbeitung [mg·L⁻¹]</i>	<i>Spüllösung, ungefällt [mg·L⁻¹]</i>	<i>Spüllösung, gefällt [mg·L⁻¹]</i>
Al	15	2	10	1047	139
Ba	2	n.n.	1	16	10
Ca	n.n.	1283	n.n.	537	526
Cu	91	n.n.	96	11	n.n.
Fe	4	n.n.	365	91	361
K	140	22	34	94	74
Mg	28	n.n.	33	332	43
Mn	n.n.	n.n.	7	n.n.	n.n.
Na	370	n.n.	303	1225	922
P	12	n.n.	29	195	n.n.
Pb	3	1	n.n.	n.n.	n.n.
S	221	445	284	656	1178
Si	12	6	26	456	101
Sr	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zn	6	n.n.	3	11	n.n.

Gerade Aluminium als Abriebmaterial sollte als elementarer, partikulärer oder kolloidaler Schwebstoff in der Emulsion vorliegen und damit den Mikroorganismen nicht zugänglich sein. Aufgrund des gewählten Aufschluss- und Analyseverfahrens kann allerdings nicht zwischen für die Kultur zugänglichen und unzugänglichen Anteilen unterschieden werden. Auf eine Zugabe von Spurennährelementen für die Kultivierung in halbertechnischem oder industriellem Maßstab kann wahrscheinlich verzichtet werden, auch wenn das Vorhandensein von Molybdat, Selenat u. a. nicht nachgewiesen werden konnte. Von deren Beimischung in Spuren unterhalb der Nachweisgrenze ist jedoch auszugehen.

Im Gegensatz zu einer Patentschrift von Garmier (1999), in der die Konzentrationen von Sb und Zn als Antioxidationsmittel in einem KSS zur Metallbearbeitung mit

500 - 2500 mg·L⁻¹ (Sb) und 100 - 3000 mg·L⁻¹ (Zn) beziffert werden, sind beide Metalle in den hier untersuchten Abwässern nicht oder nur in Spuren nachzuweisen. Ein systematischer Einsatz beider Metalle ist für alle in dieser Arbeit untersuchten KSS und Spüllösungen daher auszuschließen.

Fällung der Spüllösung

Da Experimente sowohl mit der unbehandelten Spüllösung als auch mit der mit Eisen(II)sulfat vorbehandelten Variante durchgeführt wurden, ist diese doppelt tabelliert. Der Erfolg der Fällungsreaktion wird dabei offensichtlich. Die Elemente Zn und Cu wurden durch die Fällung vollständig entfernt, während die anderen Elemente zu einem geringeren Prozentsatz der Lösung entzogen wurden. Fe und S, die durch das Fällungsreagenz zugeführt wurden, stellen hierbei die Ausnahme dar.

Darüber hinaus wurden die Zetapotentiale beider Lösungen überprüft. Das Zetapotential der ungefällten Spüllösung betrug -84 mV, das der gefällten -2,4 mV. Eine ideale Fällung wird erreicht, wenn das Zetapotential der gefällten Lösung im Bereich von -10 bis + 10 mV liegt (Müller, 1996). Die Effizienz der gewählten Fällungsmethode ist somit belegt.

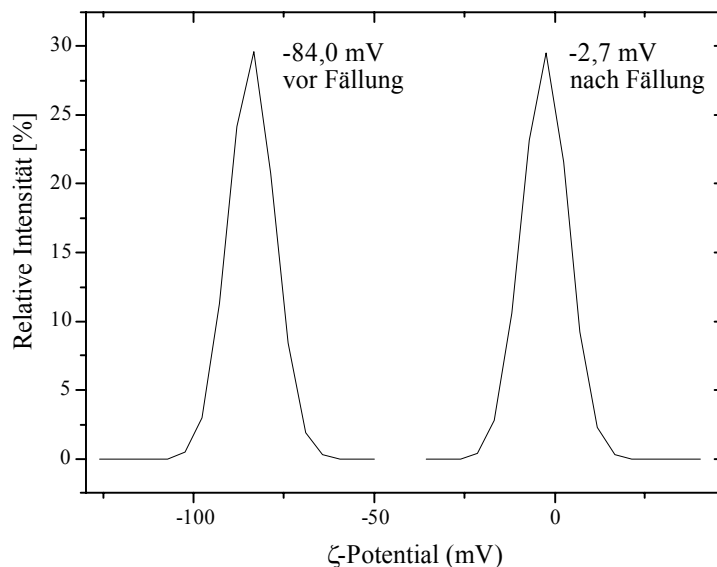


Abbildung 3-15: Bestimmung des Zetapotentials der ungefällten und der mit Fe(II)SO₄ gefällten Spüllösung.

Die feststoffreichen Lackierereiabwässer verursachten während der Durchführung der Experimente zahlreiche Probleme. Einerseits deshalb, weil ein großer Anteil der Feststoffe bereits im Vorlagebehälter trotz stetiger Durchmischung sedimentierte, andererseits behinderten die in das Reaktorgefäß geleiteten Feststoffe die Analytik massiv. Gravierender jedoch war die Tatsache, dass die Lackharze, die für die Anhaftung des Lacks an die Karosserieoberfläche und deren Versiegelung sorgen, auch im ALF an sämtlichen Oberflächen haften blieben. Bei längerem Betrieb versagte daher die Rührwelle ihren Dienst;

auch die Elektrodenoberflächen wurden bis zum Abbruch der Signaltransduktion in Mitleidenschaft gezogen.

3.4.2 Aluminiumbearbeitung

Batchexperimente

Um zu überprüfen, ob die thermophile Kultur auch zum Wachstum auf den komplexen realen Abwässern aus der Automobilproduktion befähigt ist, wurden zunächst Batchexperimente durchgeführt. Die Anzucht erfolgte, analog zu den in den vorhergehenden Unterkapiteln beschriebenen Experimenten, auf Olivenöl.

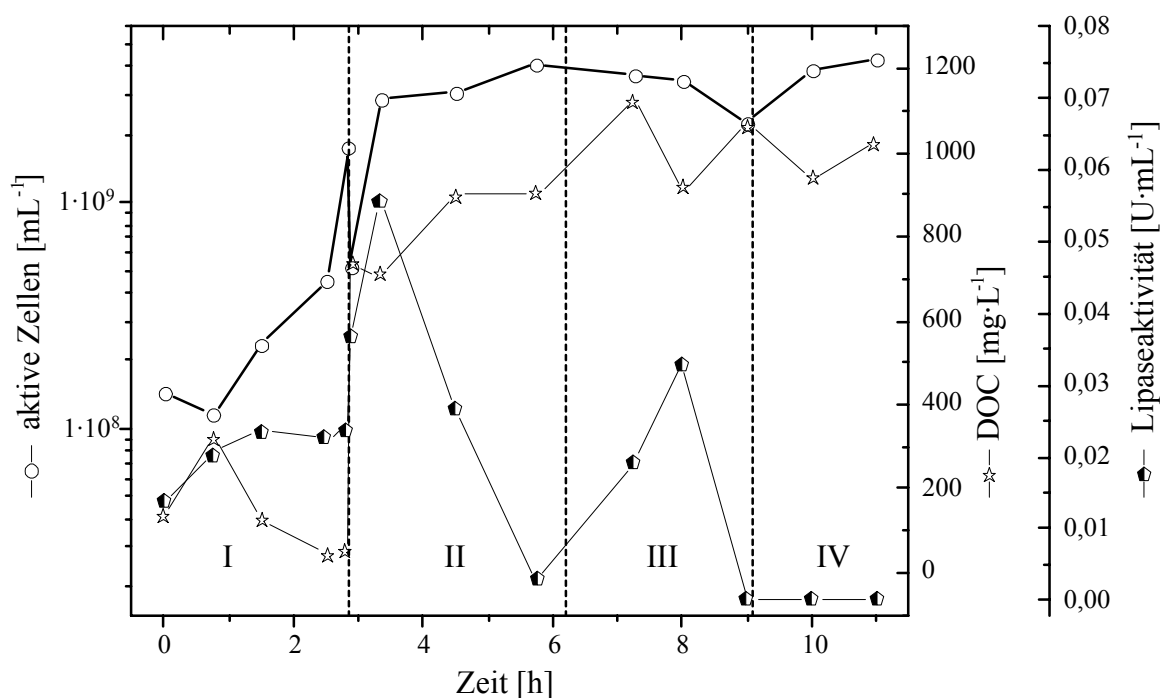


Abbildung 3-16: Batchexperiment zur Verwertbarkeit von KSS aus der Aluminiumbearbeitung. Zugabe von 135 mL KSS bei $t = 0$ zu einer spätexponentiellen Kultur auf Olivenöl. $\Delta\text{DOC}_{\text{th}} = 9200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Hilfslinien: Wachstumsphasen; Erläuterungen im Text.

In Abbildung 3-16 ist dargestellt, wie die Kultur auf die einmalige Zugabe von 135 mL KSS zur Aluminiumbearbeitung reagiert. Das Zugabevolumen wurde gewählt, um bei einem Arbeitsvolumen von 2,75 L eine Addition von $\approx 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zu erzielen.

Die Anzahl der aktiven Zellen stieg nach einer Adaptationsphase von $< 1 \text{ h}$ von ca. $1\cdot 10^8 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf $2\cdot 10^9 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ innerhalb von 3 h an. In dieser Wachstumsphase konnte eine maximale Wachstumsrate μ_{max} von $2,01 \text{ h}^{-1}$ beobachtet werden. Bei der starken Schwankung der Zelldichte im Zeitraum 2 - 3 h handelt es sich möglicherweise um ein Artefakt der Zählung. Eine weitere Erklärung für das beobachtete Phänomen ist das momentane Auftreten einer durch Mangel an bioverfügbarem Kohlenstoff bedingten

Wachstumshemmung. Die simultan zum Einbruch der Zelldichte ansteigenden Werte des DOC stützen die These der Substratlimitierung. Das im Anschluss an dieses Ereignis erreichte DOC-Niveau genügt zur Versorgung der Kultur während der Plateauphase und trägt zur Aufrechterhaltung einer konstanten Zelldichte bei.

Kontinuierliche Kultur

Entsprechend den Resultaten der Batchexperimente erwies sich die KSS zur Aluminiumbearbeitung auch während der kontinuierlichen bzw. - da nach 14,5 h die Substratzufuhr unterbrochen wurde - semikontinuierlichen Kultur als sehr gut verwertbar. Wie Abbildung 3-17 zeigt, wurde hierbei eine maximale Zelldichte von $1 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ erreicht. Im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase ist auch bei diesem Experiment ein Zelldichteeinbruch zu beobachten.

Nach Beendigung der Substratzufuhr wurde eine konstante Zelldichte von $8 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ noch über einen Zeitraum von 8 h hinweg aufrechterhalten. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Verweilzeit von 7 h für das betrachtete System etwas zu gering ist, um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen.

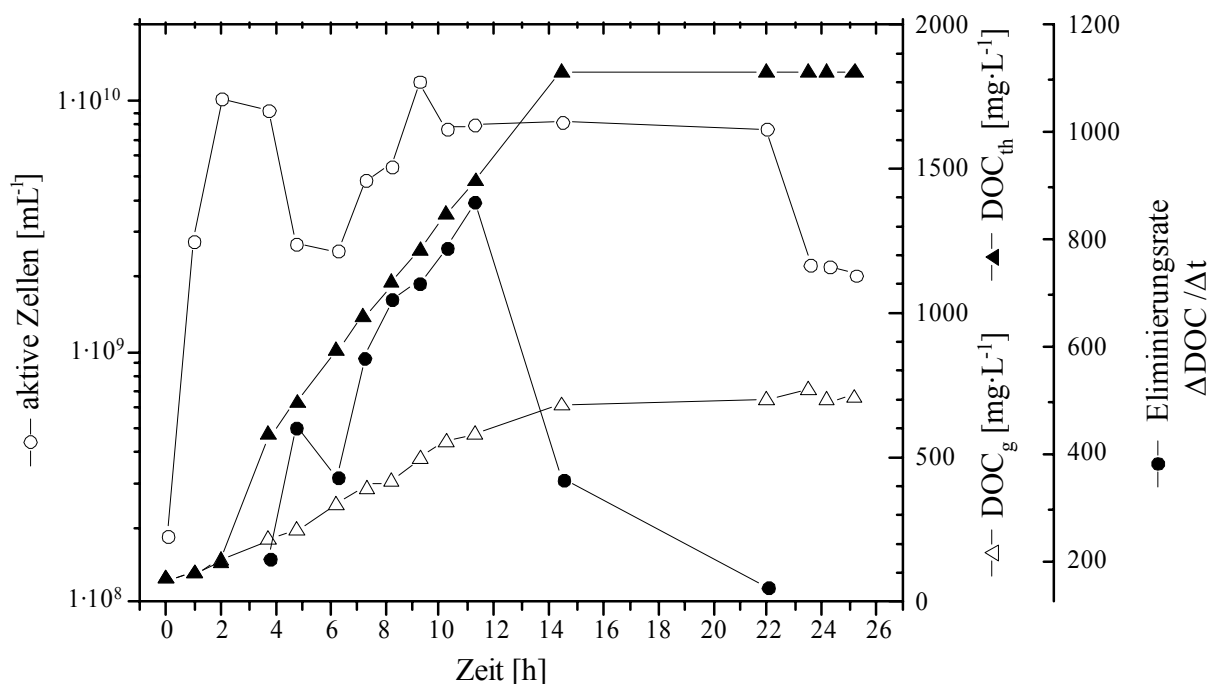


Abbildung 3-17: Semikontinuierliches Experiment mit KSS aus der Aluminiumbearbeitung zur Ermittlung der DOC-Eliminierung. Zufuhr. CSB der Vorlage $10.200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($6,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) von $t = 0 \text{ h}$ bis $t = 14,2 \text{ h}$. $\theta = 7 \text{ h}$. Bedeutung der Indizes: g (gemessen), th (theoretisch).

Des Weiteren findet sich die DOC-Eliminierungsrate als Funktion des theoretisch kumulativ gelösten Kohlenstoffs abzüglich des in Lösung gemessenen DOC aufgetragen. Aus der

Differenz zwischen dem zugeführten DOC und dem tatsächlich im System gemessenen DOC errechnet sich die DOC-Eliminierungsrate r_{DOC} zu:

$$r_{DOC} = \frac{DOC_{th} - DOC_g}{t_n - t_{n-1}} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Diskussion

Da das Phänomen des Zelldichte-Einbruches ebenfalls bei anderen, auch kontinuierlichen, Experimenten beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass u. U. Komponenten des KSS erst nach 3 - 6 h Aufenthaltszeit im System bioverfügbar werden. Die Kultur metabolisiert dabei zunächst präferenziell leicht bioverfügbare und abbaubare Komponenten und reagiert nach deren Abbau mit einem Wachstumseinbruch. Nach der Stoffwechselumstellung auf schwerer bioverfügbare Substanzen steigt die Zelldichte erneut an.

Die Formulierungen der KSS wurden so gewählt, dass deren Lebensdauer im Betrieb über 1 Jahr beträgt und sie hohe Belastungen durch Temperatur und Scherprozesse ohne Funktionalitätsverlust überstehen. Daher erscheint die Erhöhung der Löslichkeit von Substratbestandteilen durch eine rein physiokochemische Zersetzung der KSS, z. B. durch Hydratisierung oder Denaturierung, unwahrscheinlich.

Auch die Daten zur Lipaseaktivität stützen diese Vermutung. Obgleich diese während der ersten exponentiellen Phase weitgehend konstant bleibt, nimmt sie zum diskutierten Zeitpunkt sprunghaft zu. Ein zweiter Aktivitätsspeak bei $t = 8$ h bedeutet nach dieser Interpretation die Erschließung einer weiteren Fraktion des Gemisches als Kohlenstoffquelle. Die in Abbildung 3-16 eingezeichneten Hilfslinien veranschaulichen diesen Gedankengang. Da in der 4. Phase keine Lipaseproduktion mehr nachweisbar ist, wird diese entweder zur Metabolisierung weiterer Substratkomponenten nicht mehr benötigt oder durch die Anreicherung von mit der Lipase oder deren Produktion interferierenden Komponenten unterdrückt.

Angesichts aller in den vorigen Abschnitten dargelegten Argumente trifft die zweite These mit größerer Wahrscheinlichkeit zu. Als Auslöser der Lipaseinhibierung kommen insbesondere die Biozide, die als pH-Stabilisatoren verwendeten Alkanolamine, der unbekannte Korrosionsschutz sowie die Glycolderivate in Betracht. In Abhängigkeit von ihrer Struktur wirken zahlreiche Glycolderivate auch als nichtionische Tenside (Bruheim *et al.*, 1999). Nachdem die Hemmung von *Geobacillus thermoleovorans* durch nichtionische

Tenside in dieser Arbeit bereits nachgewiesen wurde (Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5) kann vermutet werden, dass diese zumindest zum Erliegen der Lipaseaktivität beitragen.

Zusammenfassung

Der KSS zur Aluminiumbearbeitung ist für eine Verwertung durch die thermophile Kultur gut zugänglich. Eine Anreicherung von Bioziden und anderen nicht bioabbaubaren Komponenten - insbesondere nichtionischen Tensiden - im Abstrom der Anlage kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.4.3 Laugenmischemulsion

Kontinuierliches Bilanzierungsexperiment mit Zellrückhaltung

Auch zur Ermittlung der Verwertbarkeit der Laugenmischemulsion aus der Anlage 16 durch die thermophile Kultur wurden Batchexperimente durchgeführt. In der Beschränkung auf zentrale Inhalte werden diese hier nicht ausführlich dargestellt, sondern nur ein Experiment, bei dem die kontinuierliche Betriebsweise gekoppelt wurde mit einer kleinmaßstäbigen Version des in Abschnitt 2.1.4.3 beschriebenen Filtrationselements.

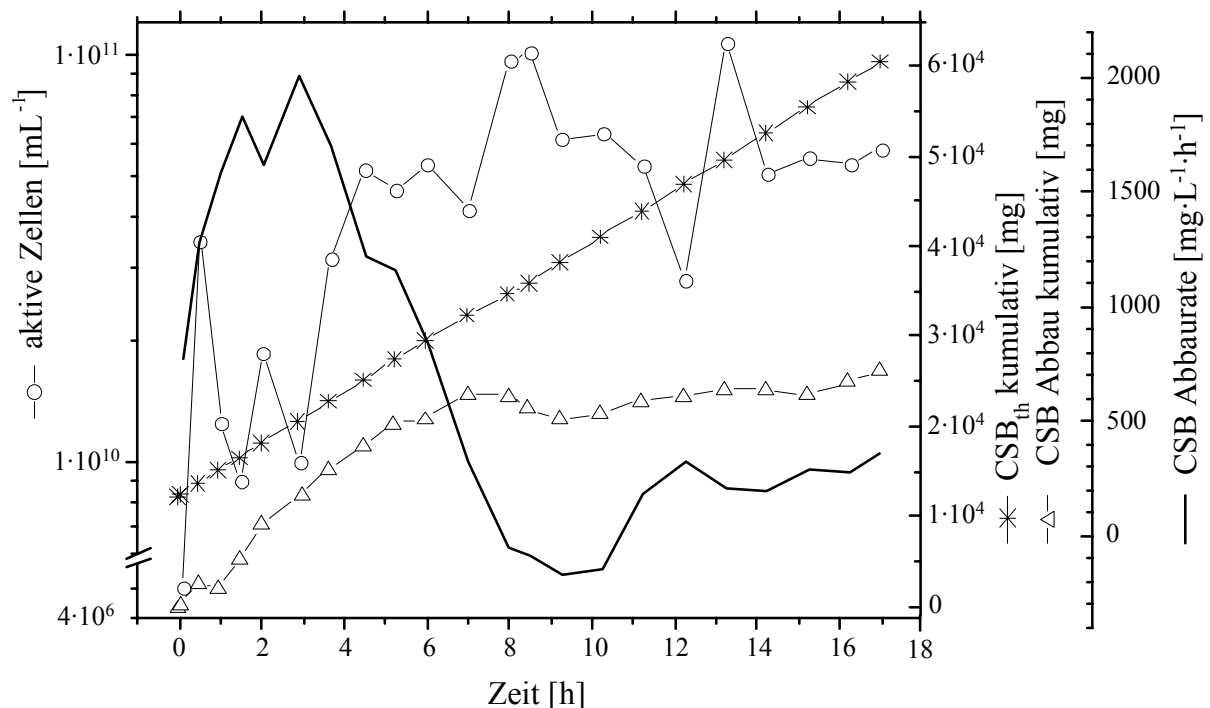


Abbildung 3-18: Kontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit der Laugenmischemulsion bei Verwendung des Filtrationselements zur Zellrückhaltung. Zufuhr der Laugenmischemulsion ($5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) ab $t = 0 \text{ h}$. CSB der Vorlage: $9640 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. $\theta = 8,3 \text{ h}$. Bedeutung des Index th: theoretisch. Darstellung der CSB Abbaurate gleitend über 4 Punkte gemittelt.

Das Anlegen eines Gegendrucks von 3 bar über ein manuell zu betätigendes Ventil bewirkte hierbei eine Aufkonzentrierung der Bakterienlösung. Bei einer Pumpleistung von 15 % der

Nennleistung ergab sich ein Volumenstrom durch das Element von $887 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sowie ein Permeatstrom von $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, was ein Gleichgewicht von Zu- und Abstrom ergab. Eine vollständige Umwälzung des Gesamtreaktorinhalts erfolgte alle 2,8 min. Bei einem hydraulischen Durchmesser des Filtrationselementes von $3,6 \text{ mm}^2$ ergab sich eine Überstömungsgeschwindigkeit von $4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Zu- und Abläufe wurden hierbei zu Gunsten des Versuchs einer Prozessbilanzierung genau überwacht. Auch eine Beprobung der Abluft durch Aktivkohle gefüllte Kartuschen wurde vorgenommen, um eine Abschätzung der Massenverluste durch Strippung zu ermöglichen.

Je nach Berechnungsgrundlage ergeben sich für die CSB-Abbauleistung des Systems unterschiedliche Werte. Die Rate des kumulativen CSB-Abbaus ($1375 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) ist größer als die durchschnittliche Abbaurate über die Zeit gemittelt ($683 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), da in letztere negative Werte zur Berechnung einfließen.

In der Bilanzierung errechnet sich der Abbau des CSB wie folgt:

$$CSB_{Abb.} = CSB_{th} - (CSB_R + CSB_{PN} + CSB_{Per.} + \bar{\mu}(CSB_{Verl.}) + \bar{\mu}(CSB_{Verw.}) + \bar{\mu}(CSB_{\ddot{U}}))$$

Gleichung 3-2

<i>Abb.</i>	<i>Abbau: berechnete CSB-Mineralisierung</i>
<i>th</i>	<i>theoretisch im System vorhandener CSB</i>
<i>R</i>	<i>Reaktor: in den Reaktorproben gemessener CSB</i>
<i>PN</i>	<i>Probenahme: durch Beprobung abgezweigter CSB</i>
<i>Per.</i>	<i>Permeat</i>
<i>Verl.</i>	<i>Verluste durch gelöste Schlauchverbindungen am Filtermodul, Systemresidualvolumen, Strippung</i>
<i>Verw.</i>	<i>Verwurf: Auffangbehälter für Schlauchvorlauf und Restmengen bei der Probenahme</i>
<i>Ü</i>	<i>Überlaufbehälter</i>

Berücksichtigt wurde hierbei nicht die Anhaftung von Biomasse an die Behälterwand, die Rührwelle und sonstige Einbauten. Es wurde davon ausgegangen, dass ein Bewuchs schon zum Zeitpunkt $t = 0$ vorhanden war und konstant über die Zeit hinweg bestehen blieb.

Da von einer Aufwuchsdichte von $1 \cdot 10^6$ bis $3 \cdot 10^9 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^2$ auf Glasoberflächen berichtet wird (Larsen und Dimmick, 1964; Topiwala und Hamer, 1971), kann dies dennoch einen Einfluss auf den Stoffumsatz bewirken. Zumal bei den insbesondere mit in Nutzung befindlichen KSS angestellten Experimenten nicht nur ein „leichter Belag“ (Topiwala und Hamer, 1971) der Behälterwand beobachtet wurde - welcher einer Zelldichte von $3 \cdot 10^9 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^2$ entsprechen würde - sondern eine zähe und nach Versuchsende nur schwer wieder zu entfernende Schicht auf Wandung und Einbauten.

Der in den Verlusten integriert angesetzte Stripping-Effekt wurde entsprechend Feitkenhauer *et al.* (2001) sowie den selbst unternommenen Messungen mit 5 % angenommen.

Diskussion

Ein auch nur annähernd für die Einspeisung in das kommunale Abwassernetz geeigneter CSB konnte hierbei trotz der hohen Zelldichte nicht erreicht werden. Die Effizienz der CSB-Entfernung aus dem System nahm im Verlauf der statischen Wachstumsphase stetig ab, wie auch aus Abbildung 3-19 ersichtlich ist. Als eine Ursache hierfür kann die zu kurz gewählte Verweilzeit genannt werden. Jedoch wurde auch in Experimenten mit niedrigeren Raumlasten ($900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\theta = 8 \text{ h}$, nicht gezeigt) nach Erreichen der Plateauphase keine höhere Eliminierungsleistung beobachtet, zumal die Zelldichte mit maximal $6,5 \cdot 10^7 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ insbesondere im Vergleich mit dem in Abschnitt 3.4.2 untersuchten KSS sehr gering ausfiel.

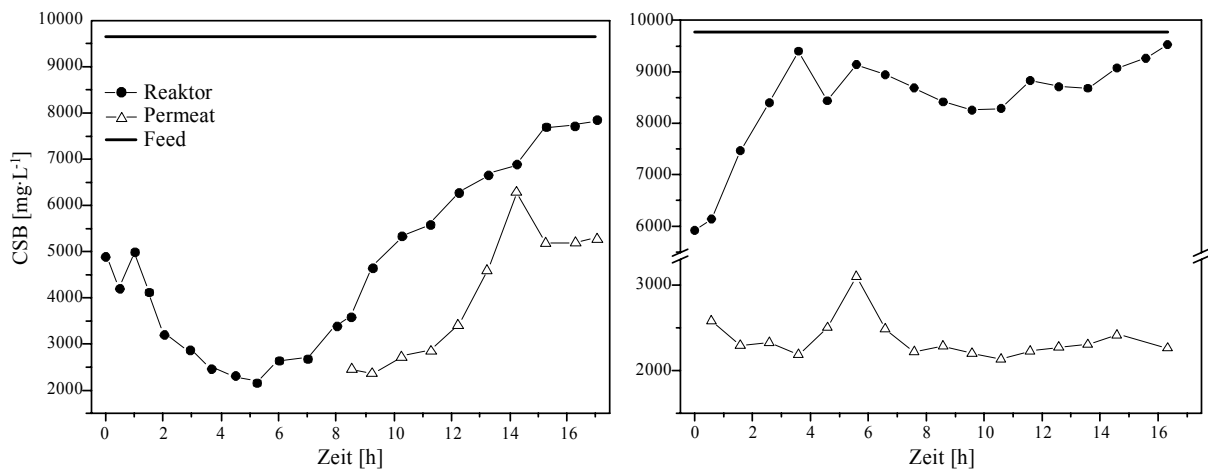


Abbildung 3-19: Verläufe des CSB (Zulauf idealisiert) für das in Abbildung 3-18 dargestellte kontinuierliche Experiment (links) und ein Wiederholungsexperiment (rechts).

Die geringe Effizienz des Filtermoduls, die durch Abtrennung der zellfreien Lösung den CSB des Permeats in Relation zum Reaktorinhalt um durchschnittlich 36 % reduzierte, konnte durch die Einführung des mehrfachen Druckstoßes bei der Rückspülung des Elements verbessert werden. Während eines gleichartigen Wiederholungsexperimentes konnte die Filtrationseffizienz auf durchschnittlich 76 % gesteigert werden und auch für weitere Experimente beibehalten werden.

Dennoch ist der Wartungsaufwand für die Zellrückhaltung bedeutend, die Reproduzierbarkeit von Experimenten ist aufgrund der Ausfallgefährdung des Elements schwierig. Die Wachstumsraten sind bei Verwendung des Filterelements nicht mit anderen Raten vergleichbar, da zu Beginn lediglich eine Eindickung der vorhandenen Zellen innerhalb der Suspension stattfindet. Ohne Verwendung des Filtrationselementes wurde $\mu_{\max} = 0,52 \text{ h}^{-1}$ beobachtet.

Welche Bedeutung die angesprochenen Biofilme für die Gesamtmetabolisierung haben können, zeigen z. B. VanGulck und Rowe (2004). Diese Autoren beobachteten eine um 2-3 Größenordnungen gesteigerte Populationsdichte für Biofilme im Vergleich mit der freien Lösung. Obwohl dies für Bodensäulen nachgewiesen wurde, gilt für Bioreaktoren das gleiche Prinzip. Der Vorteil der sessilen Mikroorganismen gegenüber den frei in Lösung befindlichen Zellen besteht darin, dass deren Geschwindigkeitsdifferenz gegenüber dem Medium erhöht ist. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit des Kontakts mit Substrat durch konvektiven Transport der Nährstoffe in die durchströmten Schichten des Biofilms (Lewandowski und Beyenal, 2003).

Dennoch sind Biofilme weder einheitliche noch statische Systeme; sie gliedern sich in Abhängigkeit vom inneren Bau des Films und der Versorgung mit O₂ und Nährstoffen in unterschiedliche Mikrostrukturen (Bishop, 2003). Dies kann zur Ausbildung von durch gänzlich verschiedene Konsortien geprägten Zonen innerhalb des Biofilms führen (vgl. Al-Awadhi *et al.*, 2003) und sogar zur Ausprägung neuer Phänotypen in nur diffusiv versorgten tieferen Schichten (Parker *et al.*, 2003). Daher sind die suspendierten Mikroorganismen nicht notwendigerweise repräsentativ für die Gesamtpopulation eines Reaktorgefäßes. Weil sich jedoch von Biofilmen laufend Zellen ablösen, besteht eine Rückkopplung zwischen beiden Systemen. Dies kann so weit gehen, dass die gesamte Leistungsfähigkeit des Reaktors und die Zelldichte in Lösung unmittelbar von diesem als „detachment“ bezeichneten Freisetzungs-prozess abhängen (Morgenroth und Wilderer, 2000). Bezogen auf das hier betrachtete System könnten die genannten Aspekte von Biofilmen erklären, weshalb besonders hohe Zelldichten für Abwässer mit adhäsiver Neigung zu verzeichnen waren. Da die Voraussetzung für die Entwicklung von Biofilmen zunächst die Anhaftung von Mikroorganismen an Oberflächen ist, können gerade die viskosen Bestandteile von KSS diesen Vorgang beschleunigen (Bishop, 2003). und die extrazelluläre Polysaccharidmatrix zusätzlich stabilisieren. Der hohe Stoffumsatz innerhalb dieses Biofilms und die Freisetzung von Zellen sorgen für hohe Zelldichten und Abbauraten.

Inwiefern die Unempfindlichkeit und die Leistungsfähigkeit des Verfahrens in Hinblick auf persistente Verbindungen evtl. die Folge der Bildung synergistischer Konsortien innerhalb des Films ist, bleibt noch zu untersuchen. Selbst wenn keine weiteren Mikroorganismen an der Bildung der Biofilme beteiligt sein sollten, könnte *Geobacillus thermoleovorans* in tieferen Zonen des Biofilms zur anaeroben Existenzweise übergehen.

Wenn die Biofilme im betrachteten Fall tatsächlich einen merklichen Einfluss auf die Abbauleistung des Systems ausüben, sollte dieser jedoch in Anlagen mit einem weiteren Verhältnis von Volumen zu innerer Oberfläche proportional abnehmen.

Zusammenfassung

Die thermophile Kultur kann die Laugenmischemulsion nur zu einem geringen Anteil verwerten.

Weiterhin kann festgehalten werden, dass ein CSB-Abbau zu CO_2 stattgefunden hat. Als Begründung dafür ist anzuführen, dass der wieder gefundene CSB einschließlich aller Verluste wesentlich niedriger liegt als der theoretisch insgesamt vorhandene, also vor Versuchsbeginn vorhandener und zugeführter CSB gemeinsam.

Die Verwendung eines Filtrationselements im Labormaßstab ist ineffektiv.

3.4.4 Graugussbearbeitung

Kontinuierliches Experiment

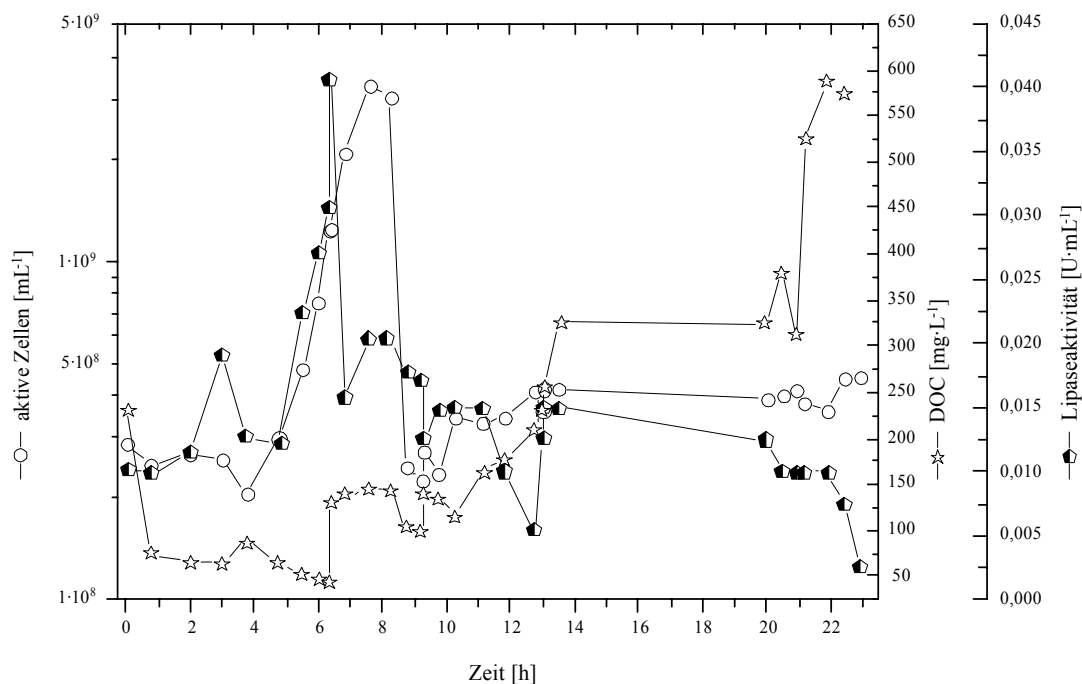


Abbildung 3-20: Semikontinuierliches Experiment unter Zufuhr des KSS zur Graugussbearbeitung. CSB der Vorlage $10.500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($6,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) von $t = 0 \text{ h}$ bis $t = 13 \text{ h}$ und von $t = 20 \text{ h}$ bis $t = 21 \text{ h}$. $\theta = 7 \text{ h}$.

Im Gegensatz zur Laugenmischemulsion erwies sich der KSS zur Graugussbearbeitung bei der Kultivierung der thermophilen Kultur als gut verwertbar. Hierbei wurde, wie schon bei dem KSS zur Aluminiumbearbeitung, eine schubweise Verwertung des Substrates beobachtet. μ_{max} betrug $1,12 \text{ h}^{-1}$, die Zelldichte pendelte sich bei $4 \cdot 10^8 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ ein.

Anhand der diskontinuierlichen Freisetzung von Lipase lassen sich auch hier mehrere Metabolisierungsphasen postulieren.

Diskussion

Oxazolidinderivate wirken inhibierend auf die Proteinbiosynthese bei Mikroorganismen, indem sie die Translation der mRNA in den Zellen verhindern (Patel *et al.*, 2001). Obwohl Zurenko *et al.* (2001) sogar von einer besonders intensiven Wirkung von Oxazolidinderivaten auf grampositive Bakterien berichten, kann dies aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente für *Geobacillus thermoleovorans* nicht bestätigt werden. Allerdings ist es durchaus möglich, dass deren Vorhandensein für die im Vergleich zum KSS zur Aluminiumbearbeitung um 55 % niedriger liegende maximale Wachstumsrate und die insgesamt geringeren Zelldichten verantwortlich ist. Dennoch wird für alle Abwässer eine für die Verfahrensführung ausreichende Zelldichte erreicht.

Auch die gleichzeitige Verwendung von anionischen und nichtionischen Tensiden wirkt sich nicht, wie von Bruheim *et al.* (1999) beobachtet wurde, negativ aus. Diese stellten fest, dass die separate Zugabe verschiedener anionischer und nichtionischer Tenside zu einer Reinkultur von alkanverwertenden *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 31012 stimulierend wirkte. Der durch gleichzeitige Tensidaddition hervorgerufene Synergieeffekt bewirkte dagegen verringerte Respirationsraten.

Zusammenfassung

Zusammenfassend können über die Verwertbarkeit des KSS zur Graugussbearbeitung die selben Aussagen wie bereits zum KSS zur Aluminiumbearbeitung getroffen werden: Auch dieser KSS ist gut verwertbar, doch kann eine Anreicherung von persistenten Komponenten nicht ausgeschlossen werden.

3.4.5 Spüllösung aus der Lackiererei und 2-Butoxyethanol

Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, stellt 2-Butoxyethanol (Butylglycolether, BE) den wirksamen Hauptbestandteil ungebrauchter Spüllösung dar. Als schwer durchführbar stellten sich jedoch Versuche mit gebrauchter Spüllösung heraus, da diese alle beweglichen Teile und Elektroden durch Verklebung mit Lackharzen zunehmend betriebsunfähig machte. Zur Umgehung dieses Problems wurde die gebrauchte Spüllösung mit Eisen(II)sulfat vorbehandelt (vgl. Abschnitt 3.4.1).

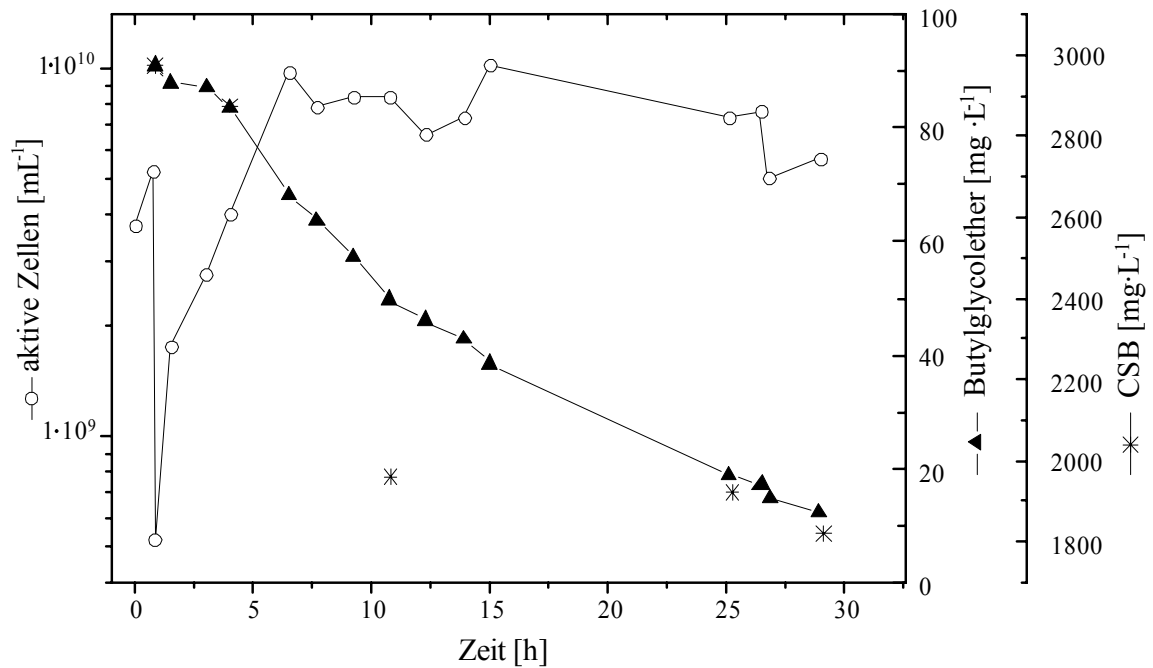


Abbildung 3-21: Batchexperiment zur Verwertbarkeit ungefällter Spüllösung. Zugabe von 20 mL Spüllösung bei $t = 0$ h. CSB der Zugabe: $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Das erste, mit ungefällter Spüllösung durchgeführte Batchexperiment dauerte dennoch über 30 h (vgl. Abbildung 3-21). Nach einem anfänglichen Einbruch der Zelldichte adaptiert sich die Kultur schnell und bewirkt bei einer Zelldichte von ca. $8 \cdot 10^8 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ die Reduktion des CSB um 40 % und eine Verringerung des BE-Gehalts der Lösung um 86 %.

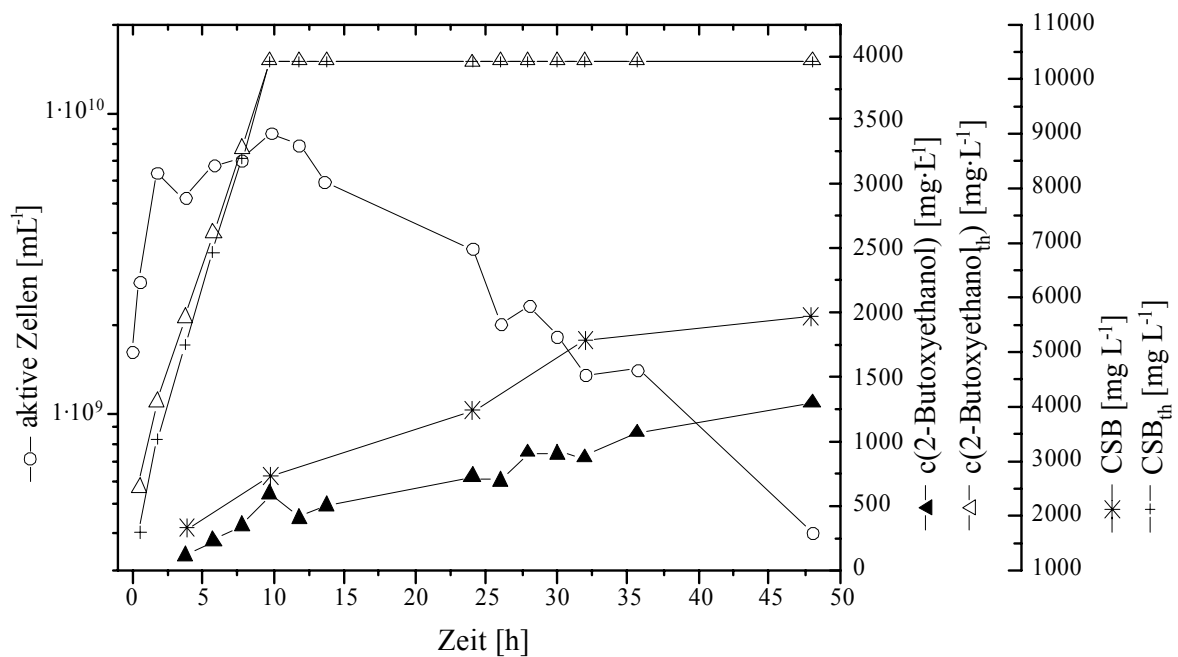


Abbildung 3-22: Semikontinuierliches Experiment zur Verwertbarkeit von 2-Butoxyethanol (BE). Zufuhr der gefällten Spüllösung ($3,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) bis $t = 7,5$. CSB der Vorlage: $10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\theta = 11$ h.

Jedoch kann anhand dieses Diagramms nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob BE tatsächlich einem Abbau unterlag oder evtl. über die Gasphase dem System entzogen wurde. Der direkte Nachweis von Metaboliten, wie z. B. 2-Butoxyessigsäure als Ergebnis der Carboxylierung des endständigen C-Atoms oder 2-Hydroxyethanal als Produkt der Spaltung der Etherbindung ist im Rahmen des Projekts nicht gelungen.

Das in Abbildung 3-22 dargestellte semikontinuierliche Experiment demonstriert zumindest die Verwertbarkeit der gefällten Spüllösung durch die thermophile Kultur. Der auch nach Abschaltung der Zufuhr noch stetig zunehmende BE-Gehalt in der Lösung bei sinkender Zelldichte deutet darauf hin, dass aus der Phase eine Nachlieferung von BE erfolgt ohne dass dieser mit gleicher Rate abgebaut wird. Hohe Zelldichten von bis zu $8 \cdot 10^9$ Zellen·mL⁻¹ wurden während der kontinuierlichen Betriebsweise beobachtet.

Diskussion

Es erscheint eher unwahrscheinlich dass diese hohen Zelldichten allein der Metabolisierung von Dimethylethanolamin (2-Dimethylaminoethanol) zuzuschreiben sind, zumal bei der Anmischung der Vorlage eine Verdünnung um den Faktor 21 vollzogen wurde. Denkbar wäre jedoch, dass eine cometabolische Verwertung von BE in Anwesenheit von 2-Dimethylaminoethanol erfolgte. Nachgewiesen wurde von Sternad (1995) die vollständige Mineralisierung beider Substanzen bei der mesophilen Behandlung von wasserbasierten Farben mit Belebtschlamm, allerdings ohne auf toxikologisch bedenkliche Metaboliten (Bormett *et al.*, 1995; Dill *et al.*, 1998) einzugehen. Allerdings belegen verschiedene Studien, dass insbesondere anaerobe Konsortien in höherem Maß als Reinkulturen zur Spaltung von Ethern befähigt sind (vgl. White *et al.*, 1996). Darin ist ein Nachteil des in dieser Arbeit beschriebenen Verfahrens zu sehen.

Als indirekter Nachweis der Metabolisierung von BE durch die thermophile Kultur wurde die Bildung von CO₂ in einem geschlossenen System bei Zugabe unterschiedlicher Substrate untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 mL der Kultur in O₂-gefüllte, gasdicht verschlossene Septaflaschen überführt und nach Zugabe verschiedener Substrate für 6 d inkubiert.

Als Substrate dienten in den Versuchsansätzen 20 µL BE, 20 µL Linolsäure und eine Mischung aus BE (15 µL) und Linolsäure (5 µL). Der Blindwert wurde in Versuchsansätzen ohne zusätzliche Substratzugabe ermittelt. Zusätzlich wurde die Konzentration an BE in Lösung nach Abschluss der Versuche ermittelt.

Dabei ergab sich eine Reduktion des BE-Gehalts um durchschnittlich 44 % für die Ansätze mit reinem BE und um 30 % für die gemischten Versuchsansätze. Bedauerlicherweise lässt sich dennoch auch aus dieser Versuchsreihe, wie in Abbildung 3-23 zu erkennen ist, keine

definitive Aussage zur Verwertbarkeit von BE treffen. Zwar wurde die geringste CO_2 -Produktion in den Blindansätzen gemessen. Dennoch unterscheiden sich die Werte der CO_2 -Produktion nicht signifikant voneinander. Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass BE durch *Geobacillus thermoleovorans* nicht vollständig mineralisiert werden kann.

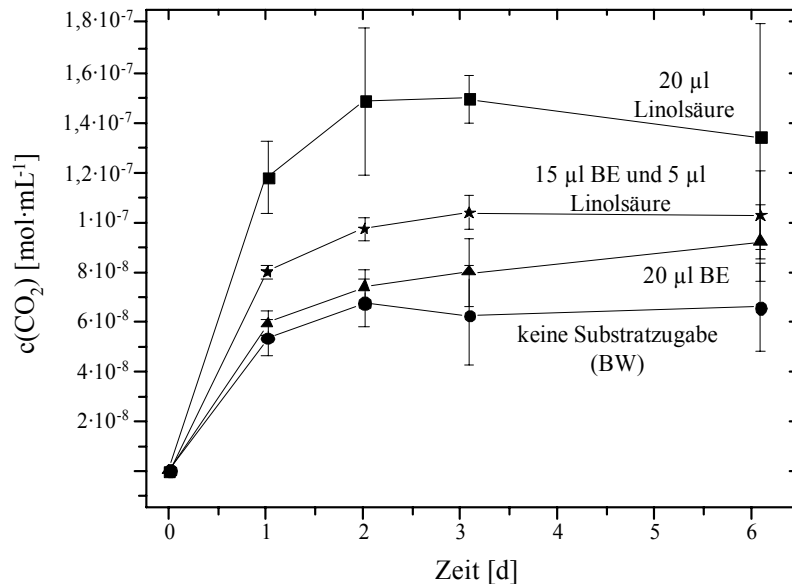


Abbildung 3-23: Indirekter Nachweis der Metabolisierung von 2-Butoxyethanol durch Ermittlung der CO_2 -Produktion im geschlossenen System.

Kritisch ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung des beschleunigten Abbaus von nichtionischen Tensiden geringen Ethoxyierungsgrades (Swisher, 1987; Tidswell *et al.*, 1996) zu sehen. Nachdem gezeigt wurde, dass die hochgradig ethoxylierten nichtionischen Tenside Tergitol NPX[®] (Ethoxyierungsgrad 9,5) und Triton X-100 (10,5) der Kultur nicht zur Verwertung zugänglich sind, die niedriger ethoxylierten Fettalkoholalkoxylate FA 1 (9) und FA 2 (2) des KSS A hingegen sehr wohl und der einfache Ether nur eingeschränkt, ist eine einheitliche und nachvollziehbare Reaktion des Mikroorganismus im Sinne vorgenannter Autoren nicht zu identifizieren.

Zusammenfassung

Eine Reinigung unvorbehandelter Lackiererei-Spüllösungen ist in einem System, in dem die Turbulenz mit beweglichen Metalloberflächen erzielt wird, technisch nicht dauerhaft möglich. Auch vom Versuch einer Cross-Flow-Filtration wird aufgrund der Adhäsionsneigung der Lackpartikel und -harze abgeraten.

Die Vorschaltung einer Fällung wäre bei der Realisierung einer Anlage unumgänglich. Bei der Realisierung einer technischen Anlage zur Reinigung Metall belasteter Abwässer müsste ohnehin eine Abtrennung metallbeladener Kolloide oder Schlämme erfolgen.

Bezüglich des Abbaus von (Poly-)Ethern durch die Kultur besteht weiterhin Forschungsbedarf. Die axenische Verfahrensführung könnte hierbei von Nachteil sein.

3.5 Experimente in der Pilotanlage

Experimente im halbertechnischen Maßstab wurden mit KSS A der Firma Henkel als Kohlenstoffquelle in der mobilen Pilotanlage durchgeführt. Während der Versuche wurden ca. $6,7 \text{ m}^3$ Leitungswasser als Anmischwasser dem Trinkwassernetz entnommen. Die Notwendigkeit hierfür hatte sich bereits in den im ALF durchgeführten Experimenten abgezeichnet. Obwohl das Permeat bzw. der Überlauf bei diesen Versuchen nicht wieder dem Vorlagebehälter zugeführt wurde, wäre dessen Rezirkulation in großtechnischen Anlagen wünschenswert.

Ergebnisse

In der ersten Versuchsphase von 0 - 144 h wurde die Verwertbarkeit eines 1 %-Ansatzes des KSS A in Wasser untersucht. Hierbei wurden die Filtrationsmodule zur Biomasserückhaltung eingesetzt. Im Permeat, das klar und geruchlos war, konnte als einzige Substanz FS 1 nachgewiesen werden.

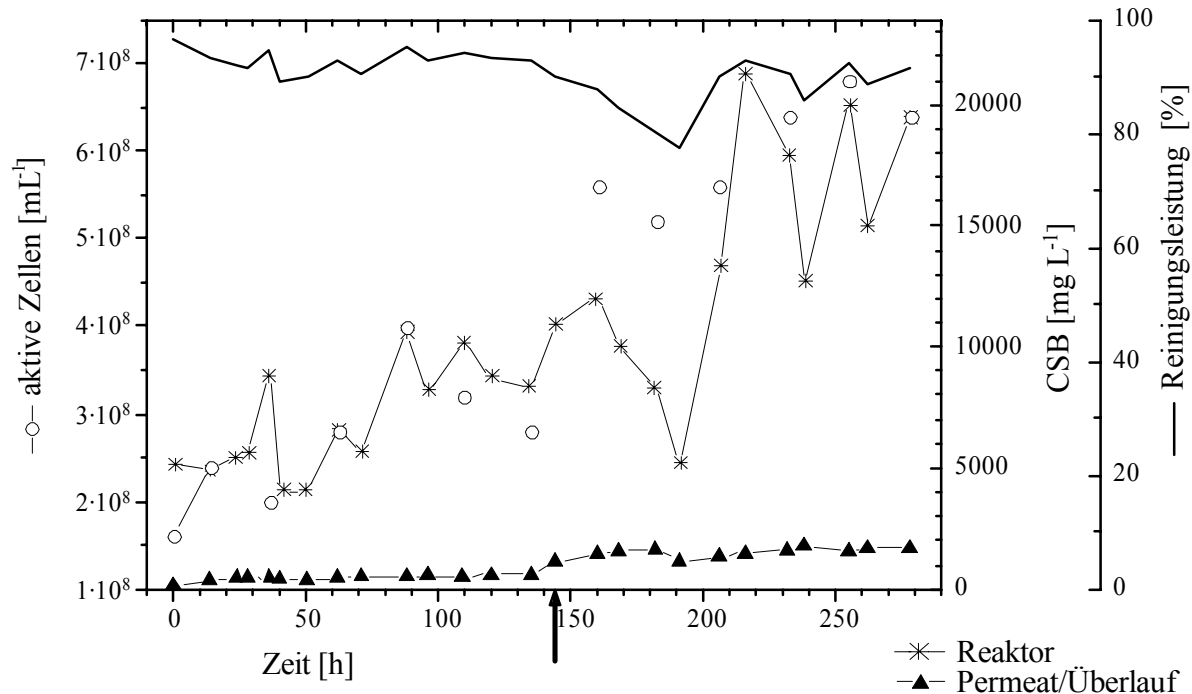


Abbildung 3-24: Kontinuierliches Experiment mit KSS A, durchgeführt in der mobilen Pilotanlage. Zufuhr von 1 % KSS A in Wasser von $t = 0 \text{ h}$ bis $t = 144 \text{ h}$, anschließend (Pfeil) Zufuhr von 5 % KSS A in Wasser. Zu Beginn des Versuchs ca. 150 L Flüssigkeitsvolumen aus vorherigem Versuch mit biologischen Fetten im Vorlagebehälter (1 m^3). Zulauf-CSB durchgängig ca. 5000 mg L^{-1} organisch, 2000 mg L^{-1} KSS A. $\theta = 12 \text{ h}$.

Die Reinigungsleistung für alle anderen Fettsäuren und Fettalkoholalkoxylate betrug 100%. Für FS 1 wurde ein durchschnittlicher Abbaugrad von 92,8% nachgewiesen. Der CSB des Permeats betrug in dieser Versuchsphase im Durchschnitt $480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mit Spitzen von maximal $589 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Somit ist die Einspeisung des Ablaufs in ein öffentliches Abwassersystem oder die Rezirkulation des Permeats als Verdünnungswasser möglich.

Bei der Umstellung des Betriebs auf die 5 ‰-Lösung fällt auf, dass der im Zulauf bzw. Reaktor gemessene CSB nicht unmittelbar auf die Konzentrationsänderung des Feed reagiert, die Zelldichte hingegen schon. Diese wuchs von $3 \cdot 10^8 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf $5,5 \cdot 10^8 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ an, obwohl die Zellretention durch die Filtrationsmodule zu diesem Zeitpunkt wegfiel.

Der Überlauf der Anlage wurde währenddessen durch eine Nachbehandlung im Schrägklärer ($\theta = 7,5 \text{ h}$) - wie in Abschnitt 2.1.4.3 beschrieben - ausgeflockt. Der abgesetzte Schlamm wurde rezirkuliert. Innerhalb der Versuchsdauer wurde, vermutlich bedingt durch die Verdünnung des Rezirkulats im Reaktorbehälter, kein negativer Effekt des Flockungsmittels auf die Zelldichte sichtbar. Zugleich erhöht sich der CSB des Permeates von zuvor durchschnittlich $460 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ auf einen Mittelwert von $1440 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Da die Überschreitung des Grenzwertes bei der höheren Raumlast dauerhaft ist, kann diese Verfahrensführung nicht für die Reinigung von KSS empfohlen werden. Trotz der im Vergleich zu Abbildung 3-12 erhöhten Zelldichte ist die Reinigungsleistung der Anlage nicht ausreichend zur Einspeisung in das öffentliche Abwassernetz. Die Effizienz der Anlage bleibt allerdings über die gesamte Versuchsdauer hinweg nahezu konstant, d. h. sie sinkt dabei nur marginal von 92 % während der ersten Phase auf 90 % CSB-Elimination während der zweiten Phase.

Diskussion

Zur Entfernung des residualen CSB bedürfte die Anlage einer Verlängerung der Verweildauer. Wie bereits im Labormaßstab nachgewiesen wurde, steht hierbei die verlängerte Verweildauer nicht mehr in wirtschaftlich sinnvoller Relation zur Verbesserung der Reinigungsleistung. Bei einer Erhöhung der Verweilzeit auf 40 h würde FS 1 weitestgehend abgebaut, der Volumenstrom durch die Anlage dabei um 70 % reduziert.

Bei gleich bleibender Retentionszeit konnte im Labormaßstab jedoch ein 3 ‰-Ansatz von KSS A in Wasser bis zum Einleitergrenzwert gereinigt werden. Projiziert man die Reinigungseffizienz der Laborexperimente von knapp 80 % auf die Pilotanlage, ergibt sich rechnerisch unter der Voraussetzung linearer Beziehungen eine notwendige Verdünnung des technischen Ansatzes von 5 ‰ auf 3,4 ‰. Dies ist mit einer Verdünnung von 1,5 des zu

reinigenden KSS, also einer Gabe von Anmischwasser im Umfang von 50 Vol.-% zu bewerkstelligen.

Auch unter diesen Voraussetzungen stellt die Raumlast von mehr als $13 \text{ kg CSB m}^{-3} \text{ d}^{-3}$ eine für aerobe Verfahren ungewöhnlich hohe Abbauleistung dar (Zimpel, 1997). Demgegenüber sind kommunale Abwasserreinigungsanlagen für die Behandlung von Abwässern mit einer durchschnittlichen CSB-Belastung von $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ausgelegt (Mudrack und Kunst, 2003).

Eine Begasung mit 0,5 vvm Druckluft erwies sich als vollkommen ausreichend für den Betrieb der Anlage. Dies ist v. a. auf die Höhe der Wassersäule im Reaktorgefäß zurückzuführen, welche eine längere Kontaktzeit der einzelnen Luftblasen mit der Flüssigkeit bedingt. Damit einher geht eine bessere Dispergierung und eine höhere Nutzungseffizienz des eingetragenen Sauerstoffs als im Labormaßstab.

Zusammenfassung

Zur Reinigung von KSS A im Pilotmaßstab bis auf den Einleitergrenzwert von $1.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ist trotz hoher CSB-Eliminierungsleistungen eine Verdünnung um den Faktor 1,5 unumgänglich. Die Grenzbelastung des Verfahrens liegt bei $13 \text{ kg CSB m}^{-3} \text{ d}^{-3}$.

3.6 Vergleich der Wachstumsraten

Wachstumsraten stellen einen der Parameter dar, die Auskunft über die Vitalität einer Mikroorganismenkultur unter den jeweiligen Umweltbedingungen geben. Unter den für den Organismus bzw. das Konsortium optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ist die Stoffwechselaktivität am höchsten und damit die Generationszeit am kürzesten. Da bei Reinigungsverfahren dem Punkt Stoffwechselaktivität und damit der Stoffumsatz- und Abbaurate der Zielsubstanzen neben der Populationsdichte höchste Priorität zukommt, stellen Wachstumsraten einen Schritt zum Überblick über die verfahrenstechnische Eignung verschiedener Abwässer dar. Daher sind in Tabelle 3-5 alle über *Geobacillus thermoleovorans* zugänglichen Angaben über erzielte Wachstumsraten zusammengefasst.

Vergleichbarkeit ist allerdings nur für identische Versuchsbedingungen gewährleistet. Als Vergleichswert darf man die Wachstumsrate auf dem von den meisten Autoren als Standardsubstrat bevorzugten Olivenöl betrachten. Hierbei fällt auf, dass die hier erzielte maximale Wachstumsrate gegenüber den in der Literatur angegebenen Werten sehr stark abfällt. D. h. auch im günstigsten Fall wurde eine um das dreifache verlängerte Verdopp-

lungszeit (75 Minuten) gegenüber den von Lee et al. (1999) genannten 24 Minuten beobachtet.

Tabelle 3-5: Maximal erzielte Wachstumsraten auf verschiedenen Substraten. Grundlage der hier aufgeführten maximal erzielten Wachstumsraten μ_{\max} sind Fermentationen unter Standardbedingungen, d. h. $\theta = 8$ h und einem Zulauf-CSB von ca. $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Autoren zum Vergleich aufgeführter weiterer Daten sind in der rechten Spalte vermerkt.

Substratgruppe	Additive oder Einzelsubstanzen	Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]	Literaturverweis/ Anmerkungen
Olivenöl	-	0,79	
	-	1,25	Becker (1999)
	-	2,5	Lee et al. (1999)
	-		
MKW- Standardsubstrat	-	0,72	
	10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS	2,48	
	100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS	0,66	
	1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS	0,47	
	10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDBS	2,70	
	100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDBS	0,52	
	1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDBS	0,61	
	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton X-100	0,71	
	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Tergitol NPX	2,42	
	Schaumshampoo	1,78	
Phenol	-	2,8	Feitkenhauer et al. (2001)
KSS Kfz-Produktion	Aluminiumbearbeitung	2,01	
	Laugenmischemulsion	0,52	
	Graugussbearbeitung	1,12	
2-Butoxyethanol (BE)	BE	0,46	
	Spüllösung, gefällt	0,84	
	Spüllösung	Nicht durchführbar	
KSS A	-	0,25	
	FA 1	0,40	
	FA 2	0,41	
	FS 1	0,32	
	FS 2	0,15	
	OLD	0,77	

Eine Ursache hierfür ist die durch die Bauart bestimmte Eignung verschiedener Bioreaktortypen für die Kultur dieses speziellen Mikroorganismus. Becker (1999) stand zur Durchführung seiner Versuche ein Laborfermenter mit einer im Bereich von 0 - 3000 Upm

regelbaren Rührerdrehzahl zur Verfügung, was ihm die Beobachtung erlaubte, dass die optimale Rührgeschwindigkeit bei 2000 Upm lag. Demgegenüber war μ_{\max} in der für diese Untersuchungen verwendeten Anlage mit ihrer Drehzahl von 700 Upm um ca. 10 % erniedrigt. Da der Organismus extrem resistent gegenüber bei höherer Drehzahl auftretenden Scherkräften ist, aber von der stärkeren Emulgierung und feineren Verteilung der Substrate profitiert, trägt eine gesteigerte Rührerdrehzahl zur Verbesserung der Wachstumsleistung bei. Dennoch ist ein Vergleich für die innerhalb dieser Studie unter identischen Bedingungen erzielten Wachstumsraten statthaft.

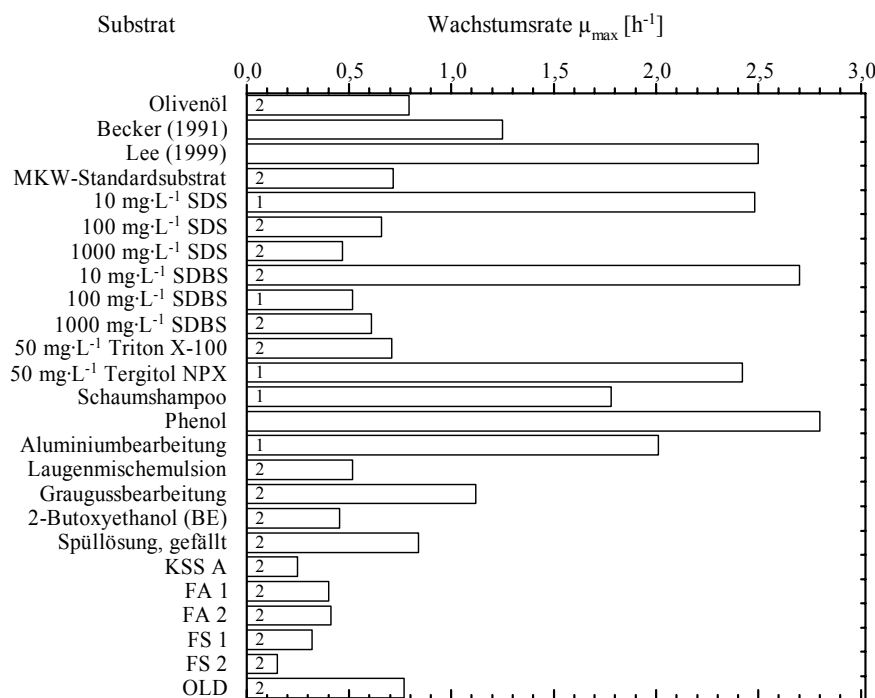


Abbildung 3-25: Auftragung der in Tabelle 3-5 zusammengefassten maximalen Wachstumsraten μ_{\max} . Die Zuordnung der Zahlenwerte wird in Unterkapitel 3.7 erläutert.

Eine Visualisierung der Daten im Balkendiagramm wie in Abbildung 3-25 lässt kein eindeutiges Muster hinsichtlich der Präferenzen der Kultur erkennen. Sie zeigt jedoch, dass Substrate existieren, die zu überdurchschnittlicher oder unterdurchschnittlicher Wachstumsleistung der Kultur beitragen. Zur Identifizierung determinierender Parameter bedarf es der Berücksichtigung zusätzlicher Informationen. Eine Generalisierung der relevanten Gesichtspunkte wird im folgenden Unterkapitel abgehandelt.

Weder die Verwertbarkeit noch die Wachstumsrate bei der Verwendung einzelner Substrate als Kohlenstoffquelle erlauben Rückschlüsse auf die Verwertbarkeit komplexer Mischungen. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Substanz FS 1. Ebenso wenig lässt sich aus den einzeln ermittelten μ_{\max} kein Rückschluss auf die Rangfolge der Nutzung der Substrate innerhalb der Metabolisierungskette ziehen.

3.7 Diskriminanzanalyse

Ziel einer Diskriminanzanalyse ist es, eine Gruppenvariable auf der Basis einer oder mehrerer Prädiktoren vorherzusagen. Es wird eine Linearkombination von Faktoren gesucht, die die Varianz zwischen den Klassen maximiert bzw. ein Maximum der Varianz zwischen den Klassen erfasst (Backhaus *et al.*, 2000; Everitt und Dunn, 2001).

Voraussetzungen

Zur gültigen Durchführung einer Diskriminanzanalyse muss das Datenmaterial verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Die Daten, in diesem Fall die Wachstumsraten μ in der Einheit h^{-1} , müssen mindestens intervallskaliert und normalverteilt sein. Obwohl das Skalenniveau den Anforderungen gerecht wird, sprach ein durchgeführter Kolmogorov-Smirnoff-Test mit Lillefors-Korrektur gegen das Vorliegen einer Normalverteilung. Nach der Transformation von μ_{\max} in μ_t mit

$$\mu_t = \sqrt{\mu_{\max}}$$

Gleichung 3-3

wurde aufgrund eines Signifikanzniveaus von 0,200 die Nullhypothese, dass die Stichprobe einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammt, angenommen und vom Vorliegen einer Normalverteilung ausgegangen.

Nach einer z-Transformation des μ_t -Datensatzes wurde das Kriterium für die Einteilung der Wachstumswerte in Gruppen entwickelt. Da bei einer Standardnormalverteilung mit $\mu = 0$ und $\sigma = 1$ 68 % aller Werte zwischen -1 und +1 liegen, wurde der Datensatz dergestalt in Gruppen eingeteilt, dass sämtliche Substrate, deren $\mu_t \leq -1$ war, als „unterdurchschnittlich“ (3) klassifiziert wurden. Ein $\mu_t \geq 1$ führte zur Einordnung als „überdurchschnittlich“ (1) und $-1 \leq \mu_t \leq 1$ galten als „durchschnittlich“ (2). Zur besseren Orientierung sind die in Klammern gesetzten Zuordnungen bereits in Abbildung 3-25 aufgetragen. Im Vergleich hierzu flossen in die Diskriminanzanalyse auch grafisch nicht repräsentierte Fälle (Tergitol® NPX und Triton X-100) ein. Diese wurden als zusätzliche Fälle der Kategorie 3 („unterdurchschnittlich“) zugeordnet.

Prädiktoren

Bei der Auswahl der Prädiktoren kommen sämtliche Daten über physikochemische Eigenschaften und Inhaltsstoffe der eingesetzten Substrate in Betracht. Aufgrund der umfangreichen Dokumentation konnte die im Anhang aufgeführte Tabelle 6-5 erstellt werden. Weder die Prädiktoren noch deren Mittelwerte oder Standardabweichungen dürfen hoch

korreliert sein. Die Korrelation der Prädiktoren zwischen zwei Gruppen soll über die Gruppen hinweg konstant sein. Die Prädiktorenwerte sollen normal verteilt sein (Backhaus *et al.*, 2000; Everitt und Dunn, 2001). Das letztgenannte Kriterium konnte nur für den Prädiktor „log Zellplateau“ als erfüllt gelten.

Da die Konzentrationen der meisten Inhaltsstoffe der KSS in Lösung nicht bekannt waren, wurde in vielen Fällen auf Schätzungen und dichotome Zuordnungen in Form von „dummy coding“ bzw. „effect coding“ zurückgegriffen (Jobson, 1992). Dies ermöglicht zumindest die Annäherung an $\mu = 0$.

Ergebnisse

Nach geeigneter Kodierung konnten alle Variablen in die Analyse einfließen. Zur Variablenselektion wurden neben der Erzielung eines minimalen Klassifizierungsfehlers zwei weitere Kriterien besonders berücksichtigt:

- Trennschärfe bezüglich der „unterdurchschnittlich“ klassifizierten Fälle (vgl. Jobson, 1992).
- Einfache und reproduzierbare Erhebung der Merkmale (vgl. Fahrmeir *et al.*, 1996).

Beide Kriterien optimal erfüllen die in Tabelle 3-6 zusammengefassten Diskriminanzfunktionen. Der Wegfall der meisten dichotomen Variablen hat seine Ursache in einem von Fahrmeir *et al.* (1996) als Paradoxon betitelten Phänomen, das auch als *Badewanneneffekt* bekannt ist. Hierbei kann zwar die Integration weiterer Variablen in die Diskriminanzfunktion die theoretische Fehlerrate reduzieren, aber zugleich erhöht sich durch die die Anzahl der zu schätzenden Variablen die Komplexität des Problems. Darunter leidet wiederum die Trennung der Gruppen, sofern die in der Variable immanente diskriminatorische Information diesen Verlust an Bestimmtheit nicht kompensiert.

Das Modell mit der geringsten Fehlerrate, welches in diesem Fall 80,8 % der ursprünglichen und 73,1 % der kreuzvalidierten Fälle korrekt klassifiziert, ist also dasjenige mit der optimierten Variablenanzahl und -auswahl.

Aufgrund des zweiten Selektionskriteriums wurde auf die Aufnahme der Variablen „log Zelldichte“, d. h. des dekadischen Logarithmus der Zelldichte während der Plateauphase, verzichtet. Eine Erhebung dieser Variable ist zum einen an die Verfügbarkeit eines geeigneten Laborfermenters gekoppelt, zum anderen, wie bereits im vorigen Abschnitt erläutert, stark von Modell und Betriebsmodus des Bioreaktors abhängig. Auch der zeitliche Aufwand von bis zu 4 Wochen (je nach Ausstattung des Labors, Anzahl der Parallelen und

Wiederholungen) ist mit der Anforderung an diese Arbeit, nämlich ein praktikables Vorhersagemodell zur Übertragbarkeit des Verfahrens zu entwickeln, nicht zu vereinbaren.

Tabelle 3-6: Prädiktoren, Koeffizienten und Kenngrößen der berechneten Diskriminanzfunktionen. Es wurden 2 Diskriminanzfunktionen berechnet, welche zusammen 100 % der beobachteten Varianz der Merkmale erklären.

<i>Prädiktor</i>	<i>Koeffizienten Funktion 1</i>	<i>Koeffizienten Funktion 2</i>	<i>Format des Prädiktors</i>
Nichtionische Tenside	0,991	0,007	Quotient Konzentration / CMC
Anionische Tenside	-0,041	-0,336	Quotient Konzentration / CMC
Amine	-0,097	-1,748	Anzahl unterschiedlicher Aminoverbindungen
Triazin	-0,080	2,115	Dichotom: 1 = vorhanden; -1 = nicht vorhanden
Eigenwert	2,904	0,177	-
Wilks' λ / Signifikanz	0,218 / 0,000	0,850 / 0,321	-
Kumulierte Varianz	94,3 %	100 %	-

Das erste der oben genannten Kriterien wird von der ersten Diskriminanzfunktion erfüllt, welche Gruppe 3 von den übrigen Gruppen separiert, also in der praktischen Anwendung die Identifikation ungeeigneter Abwässer ermöglicht. Die höchste Ladung trägt hierbei der Faktor „nichtionische Tenside“.

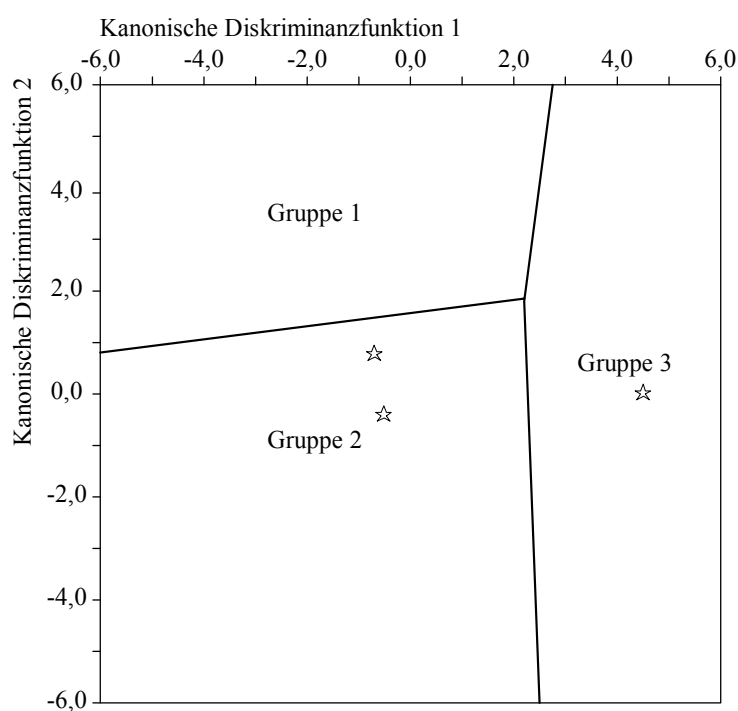


Abbildung 3-26: Territorialdarstellung der Trenngeraden zwischen den Gruppen und Gruppenzentroiden (Sternsymbole).

Die Verschärfung des Diskriminanzkriteriums auf den Wert 0,5 ermöglicht die der ursprünglichen Gruppierung angepasste Separation aller als unterdurchschnittlich eingestuften Fälle. Obwohl diese Aussage im Normalfall nicht zulässig ist, da eine Klassifikation nur aufgrund aller Diskriminanzfunktionen erfolgen soll (vgl. Fahrmeir *et al.*, 1996), kann in diesem Fall aufgrund des hohen Eigenwerts der ersten Funktion und der nahezu orthogonalen Anordnung der Fälle zueinander - veranschaulicht in der Territorialdarstellung in Abbildung 3-26 als annähernd vertikale Trenngerade - dieses Prinzip vernachlässigt werden. Demnach bedarf die Abschätzung der Verwertbarkeit eines MKW-haltigen Substrates nur der Berechnung der Prüfgröße x nach folgender Formel:

$$x = 0,991 \cdot \frac{c(n)}{CMC(n)} - 0,041 \cdot \frac{c(a)}{CMC(a)} - 0,097 \cdot m - 0,080 \cdot z \quad \text{Gleichung 3-4}$$

- n nichtionisches Tensid
a anionisches Tensid
m Anzahl Aminoverbindungen
z Triazinkriterium (-1/1)

Als CMC für nichtionische Tenside wird zur praktischen Anwendung der Wert $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ empfohlen, für unbekannte Tensidkonzentrationen ist der Wert 1 an Stelle der Quotienten einzusetzen. Für $x \leq 0,5$ kann von der Eignung des Substrats als Kohlenstoffquelle für das vorgestellte thermophile Verfahren ausgegangen werden. Zu beachten ist dabei, dass diese Interpolation v. a. für komplexe, auf organischen bzw. mineralischen Ölen basierende wässrige Lösungen mit einem $\text{CSB} \approx 10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gelten.

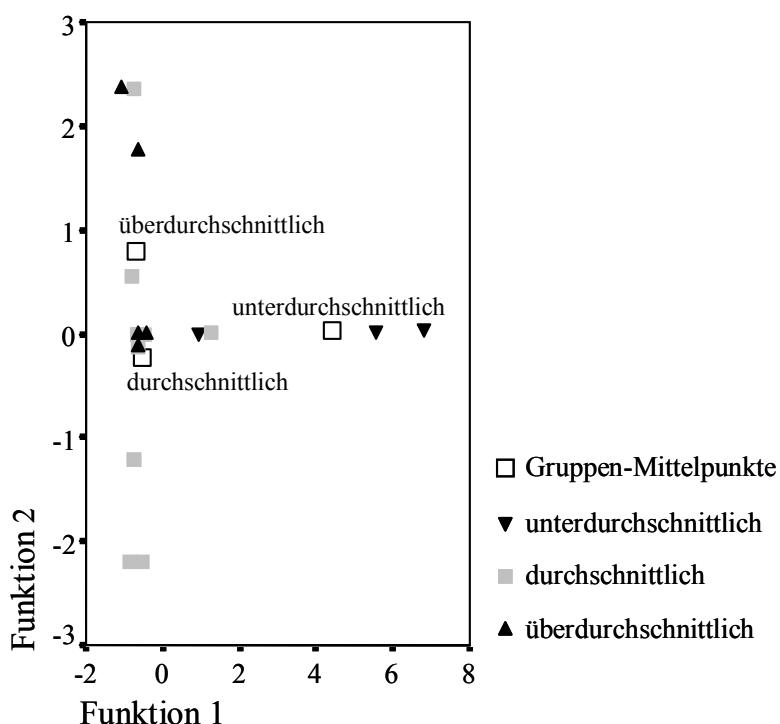


Abbildung 3-27: Darstellung der Gruppenzentroide und verarbeiteten Fälle innerhalb des durch die kanonischen Diskriminanzfunktionen aufgespannten Koordinatensystems.

Funktion 2 erlaubt eine Prognose hinsichtlich der Leistungsfähigkeit des Verfahrens; Werte ≥ 0 stehen für die überdurchschnittlich gute Metabolisierbarkeit des Substrats. Durch die Überschneidung der Gruppen ist jedoch die Zuordnung einzelner Datenpunkte zu den übergeordneten Gruppen allein aufgrund ihrer Lage nicht möglich.

Diskussion

Hinterfragt werden müssen in diesem Zusammenhang die Faktorladungen. Die Tatsache, dass nichtionische Tenside einen elementaren Einfluss auf das Verfahren haben, wurde bereits in Unterkapitel 3.2 deutlich. Erstaunlich ist dagegen, dass weder funktionelle Gruppen noch Bakterizide einen wesentlichen Einfluss auf die Diskriminierung der Gruppen ausüben. Evtl. ist eine dichotome Kodierung hierbei zu wenig differenziert. Die Ergebnisse müssen sogar dahingehend interpretiert werden, dass Triazine einen wachstumsfördernden Effekt auf die Kultur ausüben. Dass auch der Ethoxylierungsgrad nicht zur Trennung der Gruppen beiträgt wurde bereits vermutet.

Die Verlässlichkeit der hier getroffenen Aussagen ist in hohem Maß von der Repräsentativität der untersuchten MKW-haltigen Abwässer und Emulsionen abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Wert auf ein breites Spektrum praxisrelevanter Substanzen gelegt. Es ist dennoch nicht vollkommen auszuschließen, dass bislang nicht untersuchte Faktoren oder Substanzen das Wachstum und den Stoffwechsel von *Geobacillus thermoleovorans* gravierend beeinflussen könnten.

Zusammenfassung

Vorteil der ermittelten Diskriminanzfunktionen ist ihre einfache Handhabbarkeit und die klare Trennung der verfahrenstechnisch ungeeigneten von den geeigneten Substraten.

Der Nachteil dieser Gruppentrennung ist darin zu sehen, dass gute und potenziell sehr gute Verfahren nicht eindeutig zu unterscheiden sind.

4 Synthese und Ausblick

4.1 Synthese

Die thermophile Kultur von *Geobacillus thermoleovorans* war im Labormaßstab fähig, verschiedene Mineralölkohlenwasserstoffe und Kühlschmieremulsionen und zu einem geringen Anteil auch die Laugenmischemulsion aus der Kfz-Produktion als Substrat zu nutzen. Ähnliche bzw. im Fall des KSS zur Graugussbearbeitung sogar höhere Wachstumsraten und Zelldichten als bei der Verwendung des Standardsubstrats Olivenöl wurden erzielt. Die Verweildauer komplexer Abwässer ist im Vergleich zu Kontaminationen mit weniger komplexer Zusammensetzung höher anzusetzen.

Während der Experimente mit KSS A in der Pilotanlage wurde bestätigt, was sich während aller Versuche, die mit KSS und ähnlich hoch CSB-belasteten Abwässern durchgeführt wurden, bereits gezeigt hatte: Bei der Verwertung von KSS im thermophilen aeroben Ansatz ist die Bereitstellung von Anmischwasser zur Verdünnung auf einen CSB von ca. $10.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ notwendig, um eine Überlastung des Verfahrens zu vermeiden. Als maximale Raumlast für die Behandlung von KSS A wurden $13 \text{ kg CSB m}^{-3} \cdot \text{d}^{-3}$ ermittelt.

Tenside

Die CMC verschiedener Tenside wurden für das in dieser Arbeit betrachtete thermophile System bestimmt und betrugen je $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für die anionischen Tenside SDS und SDBS, sowie $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für das nichtionische Tensid Tergitol NPX[®] und $108 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für das zweite nichtionische Tensid Triton X-100. In Konzentrationen unterhalb der CMC stimulierten alle vier Tenside das Wachstum der Kultur. Ursächlich für diese Stimulation ist die Verbesserung der Bioverfügbarkeit der hydrophoben Substrate anzusehen.

Ab dem Erreichen der CMC wirkten anionische Tenside weiterhin wachstumsfördernd, nichtionische Tenside hingegen wirkten mit ansteigender Konzentration zunehmend inhibierend. Wahrscheinliche Ursachen hierfür sind Tensid-Enzym- oder Tensid-Membran-Interaktionen. Die Einlagerung von Tensiden verändert die Permeabilität der Zellmembran und beschleunigt den Transport von Biomolekülen, z. B. Enzymen, aus den Zellen. Dies bewirkt bei anionischen Tensiden eine Beschleunigung des Substratabbaus. Aufgrund der Untersuchungen von Uma Maheswar Rao und Satyanarayana (2003) ist zu erwarten, dass

dieser Effekt ebenfalls, wenngleich in geringerem Maß, bei der Zugabe kationischer Tenside zu beobachten sein wird.

Für nichtionische Tenside, v. a. Triton X-100, bestätigt sich dagegen die Hypothese von Bruheim *et al.* (1999). Triton X-100 kann sich ebenfalls in die Zellmembranen einlagern; dies führt wahrscheinlich zu den Mikroorganismen beeinträchtigenden Membrandefekten, welche evtl. im Zusammenhang mit der Konformation des Tensids stehen. Ebenso ist es möglich, dass in der Zellmembran von *Geobacillus thermoleovorans* Strukturen zu existieren, die den Organismus für eine Schädigung durch nichtionische Tenside anfällig machen.

Letzteres ist sogar wahrscheinlich, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Triton X-100 ab dem Erreichen der CMC die Lipaseaktivität zum Erliegen bringt. Somit kann von einer Interaktion des Tensids mit Enzymen oder deren Membrantransportstrukturen ausgegangen werden. Welche Enzymsysteme von *Geobacillus thermoleovorans* außer der Lipaseproduktion oder -exkretion noch betroffen sind oder sein könnten, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht feststellen.

Unabhängig davon ob das Tensid die Zellmembran oder Enzyme angreift, führt dies in jedem Fall zu Stoffwechselstörungen und damit Leistungseinbußen bei den Mikroorganismen. Die zellphysiologischen Ursachen und Mechanismen in diesem Zusammenhang zu ergründen wäre ein interessantes zukünftiges Forschungsfeld.

Bei der Anwendung des Verfahrens auf nicht untersuchte MKW enthaltende Abwässer oder KSS ist deshalb die Beimischung nichtionischer Tenside in Konzentrationen oberhalb der CMC auszuschließen, was z. B. durch eine geeignete Verdünnung des Abwassers erreicht werden kann. Im Rahmen des Vorhersagemodells kommt dementsprechend der Konzentration nichtionischer Tenside relativ zu deren kritischer Mizellenbildungskonzentration die zentrale Rolle bei der Differenzierung zwischen verfahrenstechnisch geeigneten und ungeeigneten Abwässern zu.

Metabolite und Feststoffe

Als ein Problem des verfahrenstechnisch orientierten Ansatzes ist die mögliche Toxizität der Metabolite zu nennen; eine hohe CSB-Eliminationsleistung geht nicht automatisch mit der Fähigkeit zur Beseitigung toxischer Inhaltsstoffe und Abbauprodukte einher. Die Resistenz des Organismus gegenüber zahlreichen Bakteriziden eröffnet zwar neue Möglichkeiten in der Abwasserbehandlung, appelliert jedoch deshalb um so mehr an die Verantwortung des Ausführenden, auch die Folgen der Ausnutzung dieses Umstandes zu berücksichtigen. Der nächste logische Forschungsschritt bestünde folglich darin, sich der Frage nach dem Verbleib bzw. dem Katabolismus von Bioziden während der Behandlung von Abwässern mit *Geo-*

bacillus thermoleovorans zu stellen. Auch bezüglich des Abbaus von (Poly-)Ethern durch die Kultur besteht weiterhin Forschungsbedarf, zumal auch der Ethoxylierungsgrad keinen zuverlässigen Indikator für deren Abbaubarkeit darstellt. Es ist hierbei wahrscheinlich, dass die Dominanz des Mikroorganismus während der thermophilen Abwasserbehandlung insbesondere für den Abbau von Ethern einen Nachteil gegenüber mit Konsortien betriebenen Verfahren darstellt und eine Leistungssteigerung in diesem Bereich daher nicht möglich ist.

Es wird weiterhin die Existenz eines zur β -Oxidation alternativen Alkan- und Fettsäureoxidationsmechanismus in Betracht gezogen. Dass *Geobacillus thermoleovorans* alternative Enzymsysteme z. B. zum Abbau von Naphthalin aktivieren kann, wurde bereits von Annweiler *et al.* (2000) gezeigt. Inwiefern dies mit der Fähigkeit des Mikroorganismus zur Verwertung β -substituierter Verbindungen zusammen hängen könnte, bleibt ebenfalls noch zu klären. Angesichts der Versatilität des Organismus eröffnet sich hier ein weiteres ausgedehntes Forschungsfeld.

Die Vorschaltung einer Fällung wäre bei der Realisierung einer Anlage zur Reinigung unvorbehandelter Lackiererei-Spüllösungen notwendig. Nachdem Flockungsmittel keinen negativen Einfluss auf die Kultur ausüben, kann auch eine Rezirkulation von mit Metallen und anderen Feststoffen belasteten Schlämmen aus den in Schrägklärern sedimentierten Schwebstoffen erfolgen. Ein Entsorgungspfad für diese Fraktion ist jedoch vorzusehen und bei der Entleerung oder Reinigung der Anlage wahrzunehmen.

Energetische Betrachtungen

Energetische Betrachtungen des Verfahrens wurden bereits durch Reimann (2003), allerdings ohne Berücksichtigung von Zellretentionstechniken, vorgenommen (vgl. Abbildung 6-2 im Anhang). Diesem ist zufolge der Gesamtaufwand der aeroben Verfahrensführung in jedem Fall positiv, d. h. der Anwender muss stets Energie in die Reinigung der Abwässer investieren. Der Autor zieht in seiner Arbeit die Parallele zur anaeroben Verfahrensführung, deren Energiebilanz bei Nutzung des produzierten Biogases zu einem Energiegewinn für den Betreiber führen kann (vgl. Märkl und Antranikian, 2001).

Unbestreitbar liegt hierin ein Nachteil der aeroben Verfahrensführung begründet. Rechnerisch nicht berücksichtigt blieben in der vorgenannten Studie jedoch Optionen zur Steigerung der Verfahrenseffektivität. Hierzu zählt z. B. die energetische Optimierung der Begasung, welche u. U. auch zu einer Verringerung des mechanischen Leistungseintrags durch die Rührwelle beitragen kann. Zentral zur Begrenzung des Energiebedarfs wäre zudem die Wahl einer unaufwändigen Methode zur Zellretention. Lamellenseparatoren, wie der in den pilotmaß-

stäblichen Experimenten eingesetzte, wären daher gegenüber Membrantrennverfahren zu bevorzugen.

4.2 Ausblick

Da gezeigt werden konnte, dass Lipasen auch für den Abbau von MKW-belasteten Abwässern eine zentrale Rolle spielen, könnte eine Weiterentwicklung des Verfahrens in der Zusammenführung und simultanen Behandlung von MKW-Kontaminationen und fetthaltigen Abwässern aus der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung bestehen. Positiv auf die Eliminierungsleistung könnte sich hierbei, wie bereits während dieser Arbeit in Ansätzen erprobt, die erhöhte Zelldichte im Vergleich zur Behandlung unvermischter KSS auswirken. Auch die hierdurch verbesserte Toleranz des Verfahrens gegenüber starken Schwankungen der Zulaufparameter, wie sie von Taube (2002) beobachtet wurde, würde den Prozess zusätzlich stabilisieren. Dabei könnte man sich zudem auf die bereits von Kambhu und Andrews (1969) theoretisch begründete und zahlreichen Autoren seither beobachtete autothermale Erhitzung thermophiler aerober Verfahren zu Nutze machen (Chiang *et al.*, 2001; Mohaibes und Heinonen-Tanski, 2004; Svoboda und Evans, 1987).

Eine Reduktion der MKW-Elimination durch präferenziellen Abbau von Fetten ist bisherigen Experimenten zufolge nicht zu erwarten. Zugleich würde die Verfahrensbetreuung weiter vereinfacht, da die Versorgung der Mikroorganismen mit Vitaminen und Spurenmetallen gleichermaßen gesichert wäre.

Des Weiteren wurde der abhängig von der Temperatur der zugeführten Abwässer und der Umgebungstemperatur notwendige energetische Ausgleich für mitteleuropäische Verhältnisse geplant. Ein Betrieb der Anlage zur Reinigung prozesswarmer, thermisch belasteter Abwässer (vgl. Hamer *et al.*, 1989) oder in einem tropischen Land würde die Energiebilanz entlasten. Ohnehin empfehlen sich thermophile Verfahren eher für tropische oder subtropische Regionen, in welchen die Überhitzung mesophiler Verfahren unter Feldbedingungen ein Problem darstellen kann (mündl. Mitteilung Ujang, 2003).

Mit seinem geringen Betreuungsaufwand (vgl. Mohaibes und Heinonen-Tanski, 2004) und seiner hohen Prozess-Stabilität bei kurzen Anlaufzeiten und rascher Revitalisierung bei Ausfällen (Krüger *et al.*, 2003; Taube *et al.*, 2002), weist das Verfahren die für aerobe und thermophile Anlagen typischen Vorzüge auf. Flexible Einsätze der Anlage sind möglich; zudem ist ein rascher Wissenszuwachs um diesen Verfahrenstyp und dessen Einsatzgebiete und Eigenheiten zu erwarten.

Allen durchgeführten Untersuchungen zufolge ist es gerechtfertigt, weiterhin in die Weiterentwicklung und Verbreitung thermophiler und aerober Technologien im Allgemeinen zu investieren und hierbei im Besonderen im Rückgriff auf *Geobacillus thermoleovorans* zurückzugreifen. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl derartige Verfahren als auch der Mikroorganismus das Potenzial besitzen sich für ein breites Anwendungsspektrum als Standard-Abwasserreinigungsmethode zu etablieren.

5 Literaturverzeichnis

- Al-Awadhi, H., Al-Hasan, R. H., Sorkhoh, N. A., Salamah, S. und Radwan, S: S. (2003) Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**, 181-185
- Alt, F. (2002) Krieg um Öl oder Frieden durch die Sonne, Riemann Verlag, München.
- Amend, J. P. und Shock, E. L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 175-243.
- Annweiler, W., Richnow, H. H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S. und Michaelis, W. (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 518-523.
- Antranikian, G. (1992) Microbial degradation of starch. In: *Microbial degradation of natural products*, Winkelmann, G. (Hrsg.) VCH, Weinheim.
- Arnold, K., Herrmann, A., Pratsch, L. und Gawrisch, K. (1985) The dielectric properties of aqueous solutions of poly (ethylene glycol) and their influence on membrane structure, *Biochimica et Biophysica Acta*, **815**, 515-518.
- Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, *Microbiological Reviews*, **45**, 180-209.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. und Weiber, R. (2000) Multivariate Analysemethoden, Springer-Verlag, Berlin.
- Bakshi, M. S., Kaur, R., Kaur, I., Mahajan, R. K., Sehgal, P. und Doe, H. (2003) Unlike surfactant-polymer interactions of sodium dodecyl sulfate and sodium dodecylbenzene sulfonate with water-soluble polymers, *Colloid and Polymer Science*, **281**, 716-726.
- Bariszlovich, M. Meusel, D., Tülsner, M. (1990) Die Charakterisierung mikrobieller Lipasen, *Die Nahrung*, **34**, 701 - 717.
- Barudio, G. (2001) Tränen des Teufels. Eine Weltgeschichte des Erdöls, Klett-Cotta, Stuttgart.
- Becker, P. (1999) Der biologische Abbau von Fetten durch aerobe, thermophile Bakterien: Untersuchungen zur Kinetik und zum Einsatz in der Abwassertechnik, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. und Märkl, H. (1997) Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**, 184-190.
- Beens, J. und Brinkmann, U. A. T. (2000) The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry, *TRAC - Trends in Analytical Chemistry*, **19**, 260-274.
- Bertrem, J., Cedeno, A. und Schiavi, I. (2000) Vehicle cleaning compositions that clean on contact without scrubbing, Niederlande, Internationale Patent Nr. WO 2000077138.
- Bishop, P. L. (2003) The effect of biofilm heterogeneity on metabolic processes. In: *Biofilms in Wastewater Treatment*, Wuertz, S., Bishop, P. L., Wilderer, P. A. (Hrsg.) IWA Publishing, London

- Boonchan, S., Britz, M. L. und Stanley, G. A. (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*, *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, 482-494.
- Bormett, G., A., Bartels, M. J. und Markham, D. A. (1995) Determination of 2-butoxyethanol and butoxyacetic acid in rat and human blood by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **665**, 315-325.
- Brown, W. A., Cooper, D., G. und Liss, S. N. (2000) Toluene removal in an automated cyclical bioreactor, *Biotechnology Progress*, **16**, 378-384.
- Bruheim, P., Bredholt, H. und Eimhjellen, K. (1999) Effects of surfactant mixtures, including Corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1658-1661.
- Bujan, M., Sikirič, M., Filipovič-Vinčekovič, N., Vdovič, N., Garti, N. und Füredi-Milhofer, H. (2001) Effect of anionic surfactants on crystal growth of calcium hydrogen phosphate dihydrate, *Langmuir*, **17**, 6461-6470.
- Bundt, J., Herbel, W., Steinhart, H., Franke, S. und Francke, W. (1991) Structure-type separation of diesel fuels by solid phase extraction and identification of the two- and three-ring aromatics by capillary GC-mass spectrometry, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, **14**, 91-98.
- Bury, S. J. und Miller, C. A. (1993) Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons, *Environmental Science and Technology*, **27**, 104-110.
- Chamorro Sanchez, J. M. (1998) Water treatment facility for recycling and decalcification of water in a car wash without drainage, Spanien, Patent Nr. EP 876999.
- Chhatre, S., Purohit, H., Shanker, R. und Khanna, P. (1996) Bacterial consortia for crude oil spill remediation, *Water Science and Technology*, **34**, 187-193.
- Chiang, C. F., Lu, C. J., Sung, L. K. und Wu, Y. S. (2001) Full-scale evaluation of heat balance for autothermal thermophilic aerobic treatment of food processing wastewater, *Water Science and Technology*, **43**, 251-258.
- Christie, W. W. (1992) Gas chromatography and lipids, The Oily Press, Dundee, Schottland.
- Collins, A. G., Theis, T. L., Kilambi, S., He, L. und Pavlostathis, S. G. (1998) Anaerobic treatment of low-strength domestic wastewater using an anaerobic expanded-bed reactor, *Journal of Environmental Engineering - ASCE*, **124**, 652-659.
- Comber, S. D. W., Painter, H. und Reynolds, P. (2000) Cationic and amphoteric surfactant primary biodegradation ring test, Europäische Union (Hrsg.) Brüssel.
- Cserhati, T., Illes, Z. und Nemes, I. (1991) Effect of non-ionic tensids on the growth of some soil bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**, 115-121.
- d'Ans, J. und Lax, E. (1992) Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer-Verlag, Berlin.
- de Hemptinne, J.-C., Delépine, H., Jose, C. und Jose, J. (1998) Aqueous solubility hydrocarbon mixtures, *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, **53**, 400-419.
- Deschenes, L. Lafrance, P., Villeneuve, J. P., Samson, R. (1996) Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 638 - 646.
- Dill, J. A., Kyeonghee, M. L., Bates, D. J., Anderson, D. J., Johnson, R. E., Chou, B. J., Burka, L. T. und Roycroft, J. H. (1998) Toxicokinetics of inhaled 2-butoxyethanol and its major
-

- metabolite, 2-butoxyacetic acid, in F344 rats and B6C3F1 mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **153**, 227-242.
- DIN 51521, (1999) Schmierstoffe - Kühlschmierstoffe - Wassermischbare Kühlschmierstoffe SE, Band 1: Eigenschaften und Anforderungen, Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) Beuth, Berlin.
- DIN EN 1899-1 (1998) Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen (BSB_n). Teil 1: Verdünnungs- und Impfverfahren nach Zugabe von Allylthioharnstoff, Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) Wiley-VCH, Berlin.
- DIN EN 1899-2 (1998) Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen (BSB_n). Teil 2: Verfahren für unverdünnte Proben, Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) Wiley-VCH, Berlin.
- DIN ISO 15705 (2003) Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (ST-CSB) - Küvettentest, Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.) Wiley-VCH, Berlin.
- Dohányosova, P., Sarraute, S., Dohnal, V., Majer, V. und Costa Gomes, M. (2004) Aqueous solubility and related thermodynamic functions of nonaromatic hydrocarbons as a function of molecular structure, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **43**, 2805-2815.
- DSMZ (2001) Catalogue of strains. 7. Auflage, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.
- Eisenbrand, G. und Metzler, M. (2001) Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Europäische Union (2000) Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. In: Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften vom 22.12.2000, Vol. L 327/1, Brüssel.
- Everitt, B. S. und Dunn, G. (2001) Applied multivariate data analysis, Arnold Publication Company, London.
- Fahrmeir, L., Hamerle, A. und Tutz, G. (Hrsg.) (1996) Multivariate statistische Verfahren, Walter de Gruyter, Berlin.
- Falbe, J. (Hrsg.) (1987) Surfactants in Consumer Products, Springer-Verlag, Berlin.
- Feitkenhauer, H. (1998) Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons at High Temperatures: Kinetics and Applications, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Feitkenhauer, H., Müller, R. und Märkl, H. (2003a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 °C by *Thermus* and *Bacillus* spp., *Biodegradation*, **14**, 367-372.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Mueller, R. und Maerkl, H. (2001) Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 744-750.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Müller, R. und Märkl, H. (2003b) Kinetic parameters of continuous cultures of *Bacillus thermoleovorans* sp A2 degrading phenol at 65 °C, *Journal of Biotechnology*, **103**, 129-135.

- Gallicchio, E., Kubo, M. M. und Levy, R. M. (2000) Enthalpy-entropy and cavity decomposition of alkane hydration free energies: numerical results and implications for theories of hydrophobic solvation, *Journal of Physical Chemistry B*, **104**, 6271-6285.
- Garmier, W. W. (1999) Biodegradable lubricant composition from triglycerides and oil soluble antimony, USA, Patent Nr. US 990055.
- Geerdink, M. J., van Loosdrecht, M. C. M. und Luyben, K. C. A. M. (1996) Biodegradability of diesel oil, *Biodegradation*, **7**, 73-81.
- Goudar, C., Strevett, K., Grego, J. (1999) Competitive substrate biodegradation during surfactant-enhanced remediation, *Journal of Environmental Engineering - ASCE*, **125**, 1142 - 1148.
- Guha, S., Jaffe, P. R. (1996) Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants, *Environmental Science and Technology*, **30**, 1382 - 1391.
- Hamer, G., Al-Awadhi, N. und Egli, T. (1989) Biodegradation of petrochemical industry pollutants at elevated temperatures. In: *DECHEMA Biotechnology Conferences*, Vol. 3, Behrens, D. und Driesel, A. J. (Hrsg.) Wiley-VCH, Weinheim, 823-827.
- Hao, R., Lu, A. und Zeng, Y. (2004) Effect on crude oil by thermophilic bacterium, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **43**, 247-258.
- Hebenbrock, S. (1998) Isolierung und Charakterisierung von thermophilen Mikroorganismen und deren Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Naphthalin und Benzoesäure, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Henkel KGaA (2003) Kühlschmierstoffe, Informationsschrift, Düsseldorf.
- Jimenez, I. Y. und Bartha, R. (1996) Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp., *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2311-2316.
- Jobson, J. D. (1992) Applied multivariate data analysis. Volume II: Categorical and multivariate methods, Springer-Verlag, New York.
- Kabrick, R. M. und Jewell, W. J. (1982) Fate of pathogens in thermophilic aerobic sludge digestion, *Water Research*, **16**, 1051-1060.
- Kambhu, K. und Andrews, J. F. (1969) Aerobic thermophilic process for the biological treatment of wastes-Simulation studies, *Journal Water Pollution Control Federation*, **41**, R127-R141.
- Kaneko, T. M. (1971) Reinigungsmittel zum Autowaschen, Japan, Patent Nr. DE 2260971.
- Kapley, A., Purohit, H. J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabarti, T., Khanna, P. (1999) Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium, *Bioresource Technology*, **67**, 241-245.
- Kato, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. und Kanaya, S. (2001a) Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 64-70.
- Kato, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. und Kanaya, S. (2001b) Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil-reservoir water and oil sands, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 794-800.
- Kato, T., Miyanaga, A., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. und Kanaya, S. (2001c) Gene cloning of an alcohol dehydrogenase from thermophilic alkane-degrading *Bacillus thermoleovorans* B23, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 100-102.
-

-
- Killops, S. D. und Al-Juboori, M. A. H. A. (1990) Characterisation of the unresolved complex mixture (UCM) in the gas chromatograms of biodegraded petroleums, *Organic Geochemistry*, **15**, 147-160.
- Kiyohara, Y., Miyahara, T., Mizuno, O. und Ono, K. (2000) A comparative study of thermophilic and mesophilic sludge digestion, *Water and Environmental Management. Journal of the Chartered Institution of Water Environmental Management*, **14**, 150-154.
- Klatt, A. (2001) Abbaubarkeitsuntersuchungen fetthaltiger Abwässer der Lebensmittelindustrie mit einem aerob thermophilen Verfahren und die Bestimmung von Scale-Up-Parametern für die Überführung vom Labor- in den Pilotmaßstab, Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Kleber, M. (2000) Kühlschmierstoffe: Analytisch-chemische Charakterisierung und Untersuchungen zur mutagenen Wirkung, Dissertation, Universität Dortmund.
- Kolshorn, K.-U., Wiesert, P., Götz, R. und Rippen, G. (1997) TEXTE 16/97: Ermittlung von Altölvermeidungspotentialen, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.) Berlin.
- Kosswig, K. und Stache, H. (1993) Die Tenside, Hanser, München.
- Kowalczyk, T. (1992) Auswirkungen verschiedener synthetischer Tenside auf die mikrobielle Aktivität von Böden, Dissertation, Technische Universität Berlin.
- Krejci-Graf, K. (1955) Erdöl. Naturgeschichte eines Rohstoffes, Springer-Verlag, Berlin.
- Krüger, M., Reimann, I., Märkl, H., Taube, J. und Eckert, W. (2003) Aerobe thermophile Reinigung fetthaltiger Abwässer der Lebensmittelindustrie mit *Bacillus thermoleovorans*, *Sonderband Transkript Biokatalyse*, 25-29.
- Laha, S. und Luthy, R. G. (1991) Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems, *Environmental Science and Technology*, **25**, 1920-1930.
- Lahti, W. J. (1998) Car wash wastewater treatment, USA, Patent Nr. US 6042730.
- LaPara, T. M. und Alleman, J. E. (1999) Thermophilic aerobic biological wastewater treatment, *Water Research*, **33**, 895-908.
- Larsen, D. H. und Dimmick, R. L. (1964) Attachment and growth of bacteria on surfaces of continuous-culture-vessels, *Journal of Bacteriology*, **88**, 1380-1387.
- Launer, E. (1991) Zum Beispiel Erdöl, Lamuv Verlag, Göttingen.
- le Lacheur, R. M., Sonnenberg, L. B., Singer, P. C., Christman, R. F. und Charles, M. J. (1993) Identification of carbonyl compounds in environmental samples, *Environmental Science and Technology*, **27**, 2745-2753.
- Lee, D.-W., Kim, H.-W., Lee, K.-W., Kim, B.-C., Choe, E.-A., Lee, H.-S., Kim, D.-S. und Pyun, Y.-R. (2001) Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 363-371.
- Lee, D.-W., Koh, Y.-S., Kim, K.-J., Kim, B.-C., Choi, H.-J., Kim, D.-S., Suhartono, M. T. und Pyun, Y.-R. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *FEMS Microbiology Letters*, **179**, 393-400.
- Lemmer, H. (1999) Enzymeinsatz in Fettabscheideranlagen - Problemlösung oder Problemschaffung?, *Korrespondenz Abwasser*, **46**, 1611-1615.
-

- Levitt, M. D., Klos, T. J., Besse, M. E., Hei, R. D., Hoyt, J. D., O'Connor, C., Man, V. F.-P. (2000) Alkaline cleaner composition for road-film removal and cleaning a vehicle surface, and cleaner kit, USA, Internationale Patent Nr. WO 200063331.
- Lewandowski, Z. und Beyenal, H. (2003) Mass transport in herterogeneous biofilms. In: *Biofilms in Wastewater Treatment*, Wuertz, S., Bishop, P. L., Wilderer, P. A. (Hrsg.) IWA Publishing, London
- L'Haridon, S., Miroshnichenko, M. L., Hippe, H., Fardeau, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Stackebrandt, E. und Jeanthon, C. (2002) *Petrotoga olearia* sp. nov. and *Petrotoga sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1715-1722.
- Liu, Z., Jacobson, A.M., Luthy, R.G. (1995) Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 145 - 151.
- Lupton, F. S. und Marshall, K. C. (1979) Effectiveness of surfactants in the microbial degradation of oil, *Geomicrobiology Journal*, **1**, 235 - 247.
- Marche, C., Delépine, H., Ferronato, C. und Jose, J. (2003) Apparatus for the on-line GC determination of hydrocarbon solubility in water: benzene and cyclohexane from 70 °C to 150 °C, *Journal of Chemical and Engineering Data*, **48**, 398-401.
- Margesin, R. und Schinner, F. (1998) Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**, 482 - 486.
- Margesin, R. und Schinner, F. (1999) Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate, *Chemosphere*, **38**, 3463 - 3472.
- Märkl, H. (1999) Modeling of Biogas Reactors. In: *Environmental Processes. 1: Wastewater Treatment*, Vol. 11a, Winter, J. (Hrsg.) Wiley-VCH, Weinheim.
- Märkl, H. und Antranikian, G. (2001) Verfahren zum aeroben biologischen Abbau schwer wasserlöslicher Stoffe sowie Mikroorganismus Stamm IHI-91, Deutschland, Patent Nr. EP 0859747.
- Markossian, S., Becker, P., Märkl, H. und Antranikian, G. (2000) Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic hot spring, *Extremophiles*, **4**, 365-371.
- May, W. E., Wasik, S. P. und Freeman, D. H. (1978) Determination of the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons by a coupled column liquid chromatographic method, *Analytical Chemistry*, **50**, 175-179.
- McAuliffe, C. (1966) Solubility in water of paraffin, cycloparaffin, olefin, acetylene, cycloolefin, and aromatic hydrocarbons, *Journal of Physical Chemistry*, **70**, 1267-1276.
- Merino-Teillet, M., de la Luz, V., Leon-Gonzalez, M. E., Santos-Delgado, M. J. und Polo-Diez, L. M. (1987) Improved picrate method for the spectrophotometric determination of nonionic surfactants, *Analyst*, **112**, 1323-1325.
- Milo, R., E., Duffner, F. M. und Müller, R. (1999) Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability, *Extremophiles*, **3**, 185-190.
- Mineralölwirtschaftsverband (2004) Mineralöl-Zahlen 2003, Informationsschrift, Hamburg.
-

-
- Miquel, P. (1888) Monographie d'un *Bacille* vivant au-dela de 70° centigrades, *Annales de Micrographie*, **1**, 3-10.
- Mohaibes, M. und Heinonen-Tanski, H. (2004) Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes, *Bioresource Technology*, **95**, 245-254.
- Moore, W. J. und Hummel, D. O. (1986) Physikalische Chemie, Walther de Gruyter, Berlin.
- Moreno, D. A., de Ferrer Daroca, J. A., Bravo, J., Berna, J. L. und Cavalli, L. (1998) Effects of the alkyl chain and concentration of linear alkylbenzenesulfonate on biodegradation kinetics, *Tenside, Surfactants, Detergents*, **35**, 375-378.
- Morgenroth, E. und Wilderer, P. (2000) Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms, *Water Research*, **34**, 417-426.
- Motomizu, S., Fujiwara, A. und Tôei, K. (1982) Solvent extraction - spectrophotometric determination of anionic surfactants with ethyl violet, *Analytical Chemistry*, **54**, 392-397.
- Mudrack, K. und Kunst, S. (2003) Biologie der Abwasserreinigung, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Müller, R. H. (1996) Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Nash, J. T., Day, W. C. und Wilson, A. B. (2001) Geochemical data for historic mining areas, central western slope, Colorado, U. S. Department of the Interior, U. S. Geological Survey (Hrsg.) Denver.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. und Ivanov, M. V. (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 433-446.
- Neil, T. B. (1984) Vehicle cleaning compositions, Großbritannien, Patent Nr. GB 2134132.
- Novotny, J. F. J. und Perry, J. J. (1992) Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2393-2396.
- Obermajer, M., Osadetz, K. G., Fowler, M. G. und Snowdon, L. R. (2000) Light hydrocarbon (gasoline range) parameter refinement of biomarker-based oil-oil correlation studies: an example from Williston Basin, *Organic Geochemistry*, **31**, 959-976.
- Occupational Safety and Health Administration (Hrsg.) (1990) 2-Butoxyethanol (butyl cellosolve), 2-butoxyethyl acetate (butylcellosolve acetate) method 83, Salt Lake City.
- Pak, D. und Chang, W. (2000) Factors affecting phosphorus removal in two biofilter systems treating wastewater from car-washing facility, *Water Science and Technology*, **41**, 487-492.
- Pál, R., Juhász, M. und Stumpf, Á. (1998) Detailed analysis of hydrocarbon groups in diesel range petroleum fractions with on-line coupled supercritical fluid chromatography - gas chromatography - mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **819**, 249-257.
-

- Panpanit, S., Visvanathan, C. und Muttamara, S. (2000) Separation of Oil-Water Emulsion from Car Washes, *Water Science and Technology*, **41**, 109-116.
- Parkar, S. G., Flint, S. H. und Brooks, J. D. (2003) Physiology of biofilms of thermophilic bacilli - potential consequences for cleaning, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 553-560.
- Patel, U., Yan, Y. P., Hobbs, F. W., Kaczmarczyk, J., Slee, A. M., Pompliano, D. L., Kurilla, M. G. und Bobkova, E. V. (2001) Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 37199-37205.
- Perry, J. J. (1979) Microbial cooxidations involving hydrocarbons, *Microbiological Reviews*, **3**, 59-72.
- Petueli, G. (2002) Simulation des Kühlschmierstoffkreislaufs zur Optimierung einer umwelt- und ressourcenschonenden Produktionstechnik, Forschungsbericht, Universität-GH Paderborn, Abt. Soest.
- Quiroga, J. M., Perales, J. A., Romero, L. I. und Sales, D. (1999) Biodegradation kinetics of surfactants in seawater, *Chemosphere*, **39**, 1957-1969.
- Raghuraman, H., Pradhan, S. K. und Chattopadhyay (2004) Effect of urea on the organization and dynamics of Triton X-100 micelles: A fluorescence approach, *Journal of Physical Chemistry B*, **108**, 2489-2496.
- Reimann, I., Klatt, A. und Märkl, H. (2002a) Behandlung fetthaltiger Abwässer der Lebensmittelindustrie mit einem thermophilen Mikroorganismus, *Chemie Ingenieur Technik*, **74**, 508-512.
- Reiman, I., Klatt, A. und Märkl, H. (2002b) Treatment of wastewater containing fat from food industry with a thermophilic microorganism, *Engineering in Life Sciences*, **2**, 398-401.
- Reimann, I. (2003) Thermophile Behandlungsverfahren zur Reinigung fetthaltiger Abwässer, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Ron, E. Z. und Rosenberg, E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation, *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 249-252.
- Rontani, J.-F., Bertrand, J.-C., Blanc, F. und Giusti, G. (1986) Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry applied to the determination of a new pathway of pristane degradation by a marine mixed bacterial population, *Marine Chemistry*, **18**, 9-16.
- Rosenberg, E., Lefmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E. und Ron, E. Z. (1992) Petroleum bioremediation - a multiphase problem, *Biodegradation*, **3**, 337-350.
- Rudin, R. E. und Lohr, R. H. (2000) Car wash cleaner containing ethylene oxide-propylene oxide copolymers, USA, Internationale Patent Nr. WO 2000071655.
- Saro-Wiwa, K. (1991) Similia: Essays on anomic nigeria, Saros International Publishers, London.
- Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. und Fall, R. R. (1979) Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation, *Applied and Environmental Microbiology*, **38**, 742-746.
- Scheffler, U., Kiese, S. und Pilepp, E. (1982) Aerob-thermophile Reinigung organisch hochbelasteter Abwässer, *wlb "wasser, luft und betrieb"*, **10**, 32-36.
- Schindler, V. (1997) Kraftstoffe für morgen - Eine Analyse von Zusammenhängen und Handlungsoptionen, Berlin.
-

-
- Schmidt, J., Hühsam, A. und Dyck, M. (2000) Technologienetz Trockenbearbeitung -Wege zur angewandten Trockenbearbeitung in der Produktion, *VDI-Berichte*, **1532**, 229-236.
- Schöberl, P. (1989) Basic principles of LAS biodegradation, *Tenside, Surfactants, Detergents*, **26**, 86-94.
- Shaw, D. G. (Hrsg.) (1989a) Hydrocarbons with water and seawater. Part 1: Hydrocarbons C₅ to C₇, Pergamon Press, Oxford.
- Shaw, D. G. (Hrsg.) (1989b) Hydrocarbons with water and seawater. Part 2: Hydrocarbons C₈ to C₃₆, Pergamon Press, Oxford.
- Sigurgísladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jonnson, A., Kristjánsson, J. K. und Matthiasson, E. (1993) Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot-springs, *Biotechnology Letters*, **15**, 361-366.
- Solano-Serena, F., Marchal, R., Ropars, M., Lebeault, J.-M. und Vandecasteele, J. P. (1999) Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons, *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 1008-1016.
- Sternad, W., Kempter, B., Wisst, S., Trick, I. und Trösch, W. (1995) Microbial purification of waste water from varnish processes with waterbourne paints. In: Biochemical Engineering 3, Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie (Hrsg.) Stuttgart, 129-131.
- Stucki, G. und Alexander, M. (1987) Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 292-297.
- Sürücü, G. A., Chian, E. S. K. und Engelbrecht, R. S. (1976) Aerobic thermophilic treatment of high strength wastewaters, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **48**, 669-679.
- Svoboda, I. F. und Evans, M. R. (1987) Heat from acration of piggery slurry, *Journal of Agricultural Engineering Research*, **38**, 183-192.
- Swisher, R. D. (1987) Background and perspective. In: *Surfactant Biodegradation*, Schick, M. J. und Fowkes, F. M. (Hrsg) Marcel Dekker, New York.
- Taube, J. (2001) Vorkommen von Pflanzenschutzmitteln im Bioabfall und Verhalten ausgewählter Pflanzenschutzmittel bei der Bioabfallbehandlung in anaeroben und aeroben Prozessen, Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK), Bayreuth.
- Taube, J., Eckert, W., Kaiser, S., Lindenberger, M. und Reimann, I. (2002) Anpassungsfähige Fettfresser, *Betriebshygiene und Umwelttechnik*, **7-8**, 50-51.
- Thibault, S. L., Aanderson, M., Frankenberger, W.T. Jr. (1995) Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 283-287.
- Thiem, A. (1994) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 258 - 263.
- Tidswell, E. C., Russell, N. J. und White, G. F. (1996) Ether-band scission in the biodegradation of alcohol ethoxylate nonionic surfactants by *Pseudomonas* sp strain SC25A, *Microbiology-UK*, **142**, 1123-1131.
- Todd, C. und Bielefeldt, A. (2000) Effects of surfactants and temperature on PCP biodegradation, *Journal of Environmental Engineering - ASCE*, **7**, 635-643.
-

- Topiwala, H. H. und Hamer, G. (1971) Effect of wall growth in steady-state continuous cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, **8**, 919-922.
- Turkovskaya, O. V., Muratova, A. Y. und Panchenko, L. V. (1999) Selection and study of surfactant and mineral oil-degrading microbial consortia, *Resources, Conservation and Recycling*, **27**, 169-178.
- Uma Maheswar Rao, J. L. und Satyanarayana, T. (2003) Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca^{2+} -independent α -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants, *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 191-196.
- Urano, K., Saito, M. (1985) Biodegradability of surfactants and inhibition of surfactants to biodegradation of other pollutants, *Chemosphere*, **14**, 1333-1342.
- VanGulck, J. F., Rowe, R. K. (2004) Evolution of clog formation with time in columns permeated with synthetic landfill leachate, *Journal of Contaminant Hydrology*, im Druck.
- VDI (1999) Entsorgung von Kühlschmierstoffen, Verein deutscher Ingenieure (Hrsg.) Düsseldorf.
- Vipulanandan, C. und Ren, X. (2000) Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, *Journal of Environmental Engineering - ASCE*, **126**, 629-633.
- Volkerling, F., Breure, A. M., van Andel, J.G., Rulkens, W.H. (1995) Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1699-1705.
- Wang, Z., Fingas, M. und Li, K. (1994a) Fractionation of a light crude oil and identification and quantification of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, Part 1, *Journal of Chromatographic Science*, **32**, 361-365.
- Wang, Z., Fingas, M. und Li, K. (1994b) Fractionation of a light crude oil and identification and quantification of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, Part 2, *Journal of Chromatographic Science*, **32**, 367-382.
- Ward, O., Singh, A. und Van Hamme, J. (2003) Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 260-270.
- Weinert, K. (1999) Trockenbearbeitung und Minimalmengen Kühlschmierung, Springer-Verlag, Berlin.
- Weinert, K., Adams, F. J. und Tharnke, D. (1995) Was kostet die Kühlschmierung, *Technika*, **7**, 19-23.
- White, G. F., Russell, N. J. und Tidswell, E. C. (1996) Bacterial scission of ether bonds, *Microbiological Reviews*, **60**, 216-232.
- Wilhelmy, L. (1863) Über die Abhängigkeit der Capillaritätsconstanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers, *Annalen der Physik*, **119**, 177-187.
- Witworth, D. A., Moo-Young, M. und Viswanatha, T. (1973) Hydrocarbon fermentations: oxidation mechanisms and non-ionic surfactant effects in a culture of *Candida lipolytica*, *Biotechnology and Bioengineering*, **15**, 649-675.
- Wynn, B. F., Linden, W. V. und Backman, R. C. (1997) Evaluation of the oxygen transfer characteristics of aeration systems operating in thermophilic temperature ranges. In: *Proceedings of the 52nd industrial waste conference*, Alleman, J. E. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton.
-

-
- Yakabe, Y., Etoh, C., Matsunobu, Y., Katsuura, H., Miura, K. und Yoshimura, K. (1992) Kinetic study on the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in well-water, *Chemosphere*, **24**, 969-977.
- Yaws, C. L., Nijhawan, S. und Li, K. Y. (1995) Diffusion coefficients in water. In: *Handbook of transport property data*, Yaws, C. (Hrsg.) Gulf Publishing Company, Houston, 141-168.
- Zaikin, V. G., Yakushin, V. N., Volnina, E. und Mikaya, A. I. (1999) Cycloorganosilyl derivatives for the determination of alcohols and carboxylic acids by gas chromatography/mass spectrometry, *European Mass Spectrometry*, **5**, 23-31.
- Zarilla, K. A. und Perry, J. J. (1987) *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, **9**, 258-264.
- Zhang, C., Valsaraj, K. T., Constant, D. und Roy, D. (1999) Aerobic biodegradation kinetics of four anionic and nonionic surfactants at sub- and supra-critical micelle concentrations, *Water Research*, **33**, 115-124.
- Zimpel, J. (1997) Industrielle und gewerbliche Abwassereinleitungen in öffentliche Abwasseranlagen, Expert Verlag, Renningen-Malsheim.
- Zurenko, G. E., Gibson, J. K., Shinabarger, D. L., Aristoff, P. A., Ford, C. W. und Tarpley, W. G. (2001) Oxazolodinones: a new class of antibacterials, *Current Opinion in Pharmacology*, **1**, 470-476.
-

6 Anhang

6.1 Abbildungen

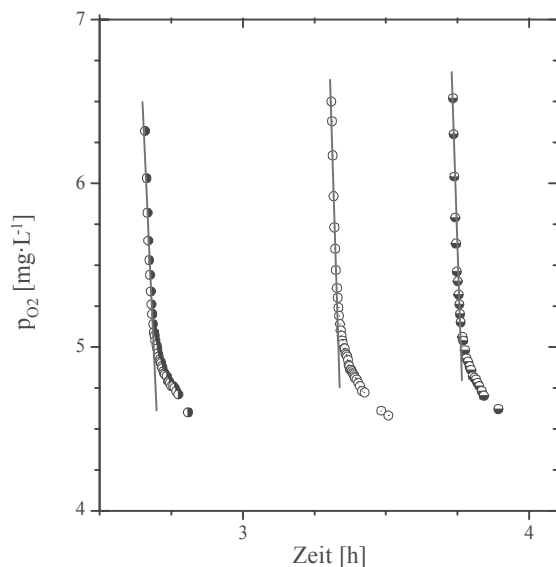


Abbildung 6-1: Ermittlung der OUR durch Anpassung einer Regressionsgeraden an den linearen Bereich des Abfalls der O_2 -Sättigung. Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 3-3

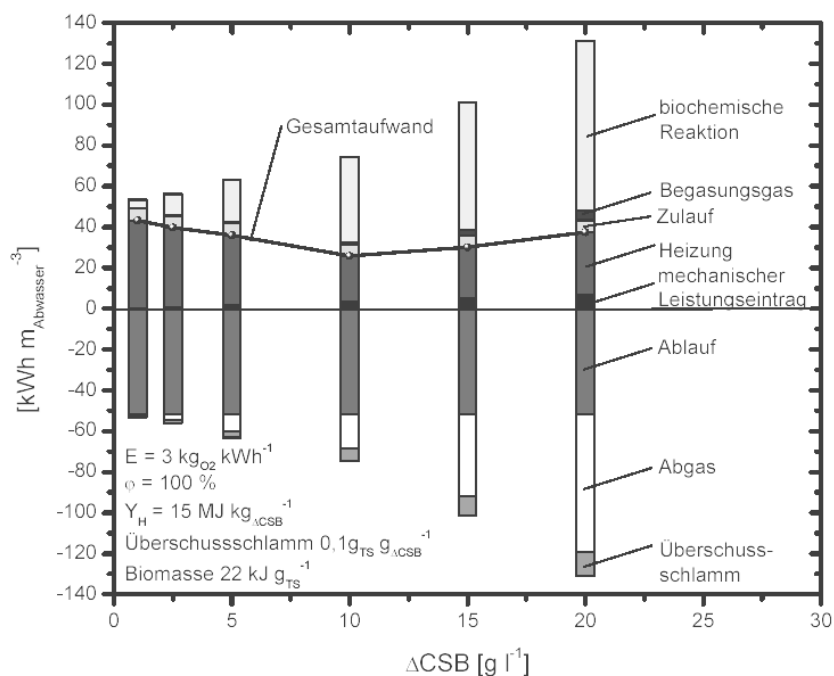


Abbildung 6-2: Energiebilanz pro m^3 Abwasser als Funktion der CSB-Elimination für die Reinigung fettbelasteter Abwässer in der mobilen Pilotanlage (aus: Reimann, 2003).

6.2 Tabellen

Tabelle 6-1: Technische. Angaben zu den Filtermodulen der Pilotanlage

<i>Komponente</i>	<i>Detail</i>
Konstruktion	19-Kanal-Membran
Material	Aluminiumoxid
Trenngrenze	0,4 µm
Kanalquerschnitt	6 mm
Transmembrane Druckdifferenz	ca. 4,5 bar
Rel. Filterfläche	5,3 m ² ·m ⁻³

Tabelle 6-2: Zusammensetzung von Reinigungsmitteln für Kraftfahrzeuge

<i>Komponente</i>	<i>Kaneko (1971)</i> <i>[Gew.-%]</i>	<i>Bertremet al.</i> <i>(2000) [Gew.-%]</i>	<i>Neil (1984)</i> <i>[Gew.-%]</i>
Nichtionisches Tensid	5-20	k. A.	2-20
Anionisches Tensid (LAS)	6-10	0,2-10	1-10
Hydrotrop	4-8	k. A.	1-10
Korrosionsschutz	0,2-0,7	k. A.	k. A.
Komplexbildner	k. A.	0,01-15	k. A.

Tabelle 6-3: Struktur- und Summenformeln ausgewählter Tenside.

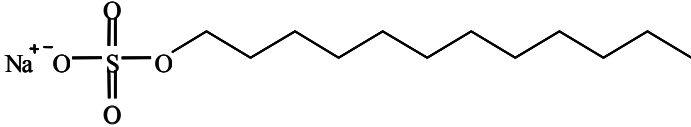
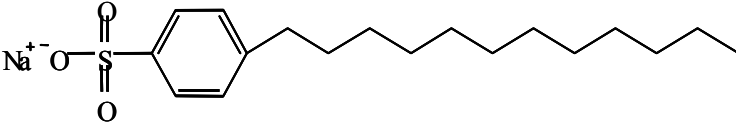
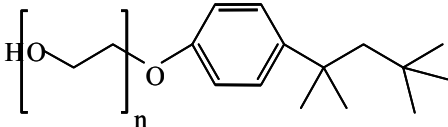
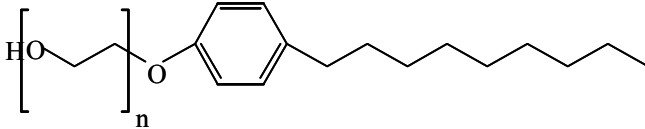
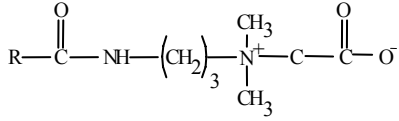
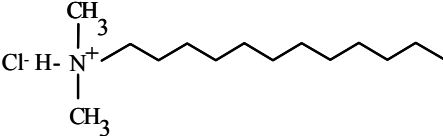
<i>Name</i>	<i>Summenformel</i>	<i>Strukturformel</i>
Natriumlaurylsulfat anionisch	Na C ₁₂ H ₂₅ SO ₄	
Natriumdodecylbenzolsulfonat anionisch	Na C ₁₈ H ₂₉ SO ₃	
Triton X-100 nichtionisch	C ₁₄ H ₂₁ O(CH ₂ CH ₂ O) _{9,5} H	
Tergitol® NPX nichtionisch	C ₁₅ H ₂₃ O(CH ₂ CH ₂ O) _{10,5} H	
Kokosamidopropylbetain amphoter	C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₂	
Dodecyltrimethylammoniumchlorid kationisch	C ₁₄ H ₃₁ NCl	

Tabelle 6-4: Zusammensetzung Kühlschmierstoff KSS A der Firma Henkel.

<i>Abkürzung</i>	<i>Anteil ca. [Gew.-%]</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Funktion</i>
MOP	15	Mineralöl, paraffinisch	Schmierstoff
OLD	15	Ölsäurederivat, langkettig, ungesättigt	
FS 1	9	Fettsäure, kurzkettig, verzweigt	
FS 2	9	Fettsäure, kurzkettig, gesättigt	
FA 1	8	Fettalkoholalkoxylat, mittelkettig, gesättigt	
FA 2	8	Fettalkoholalkoxylat, langkettig, ungesättigt	
FSR	8	Fettsäure-Triglyceride aus Rüböl, ölsäurehaltig	
KOH	14	Kaliumhydroxid	Neutralisator
AM 1	3	Alkanolamin	Fungizid
AM 2	3	Hydroxyaminoalkanol	
CAR	1	Carbamat	
PHO	< 1	Phosphonsäure, aliphatisch	
TRI	< 1	Triazol, aromatisch	
ECS	1	Ethercarbonsäuregemisch	Co-Tensid, Entschäumer
PAG	< 1	Polyglycol, aliphatische Ester, Polyethersiloxane	
TFH	< 1	Tallölfettsäure (25 - 30 % Harze)	Emulgatoren
TFA	< 1	Tallölfettsäureamid, ethoxiliert	
FA 3	< 1	Fettalkoholethoxylat, langkettig	
AAB	< 1	Alkanolaminborat	Bakterizide
OXA	< 1	Oxazolidinderivat	

Tabelle 6-5: Prädiktoren der Diskriminanzanalyse

<i>Name</i>	<i>wrate</i>	<i>w_wrate</i>	<i>z_w_wrate</i>	<i>gruppe</i>	<i>ten_an</i>	<i>ten_nich</i>	<i>bz4</i>	<i>ethoxy</i>	<i>bz1</i>	<i>bz2</i>	<i>bz3</i>	<i>bz5</i>	<i>schaum</i>	<i>typ</i>	<i>iso</i>	<i>unges</i>	<i>log_zell</i>
Olivenöl	0,79	0,89	0,27	2	0,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1	1,0	1,0	8,7
MKW-St.	0,72	0,85	0,18	2	0,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	8,7
SDS10	2,48	1,57	1,77	1	0,2	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,3
SDS100	0,66	0,81	0,09	2	2,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,5
SDS1000	0,47	0,69	-0,17	2	20,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,2
SDB 10	0,82	0,91	0,31	2	0,2	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,8
SDBS100	1,71	1,31	1,20	1	2,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,5
SDBS1000	0,62	0,79	0,05	2	20,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,3
Tri50	0,71	0,84	0,16	2	0,0	0,5	-1,0	9,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,6
Tri500	0,00	0,00	-1,69	3	0,0	4,6	-1,0	9,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,3
Tri2000	0,00	0,00	-1,69	3	0,0	18,5	-1,0	9,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,0
Terg50	2,42	1,56	1,75	1	0,0	0,6	-1,0	10,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,3
Terg500	0,00	0,00	-1,69	2	0,0	5,6	-1,0	10,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,0
Terg2000	0,00	0,00	-1,69	3	0,0	22,2	-1,0	10,5	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	1,0	1,0	9,0
Polin	1,78	1,33	1,24	1	1,0	1,0	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	-1,0	2	0,5	0,5	10,0
Alu	2,01	1,42	1,44	1	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	-1,0	-1,0	-0,5	-0,5	2	0,5	0,5	9,6
Lauge	0,52	0,72	-0,11	2	0,0	1,0	2,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-0,5	1,0	2	0,5	0,5	7,8
Grau	1,12	1,06	0,65	2	1,0	1,0	1,0	8,0	1,0	1,0	-1,0	-0,5	-0,5	2	0,5	0,5	8,6
BE	0,46	0,68	-0,19	2	0,0	0,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	2	-1,0	-1,0	9,3
Spül gef	0,84	0,92	0,34	2	0,0	0,0	1,0	1,0	-0,5	-0,5	-0,5	-0,5	-1,0	2	0,5	-0,5	9,8
KSS A	0,25	0,50	-0,59	2	0,0	1,0	1,0	9,0	-0,5	1,0	1,0	-0,5	1,0	2	0,5	0,5	7,7
FA 1	0,40	0,63	-0,30	2	0,0	0,0	-1,0	9,0	-1,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	0,5	-0,5	9,4
FA 2	0,41	0,64	-0,28	2	0,0	0,0	-1,0	2,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	2	0,5	-0,5	8,8
FS 1	0,32	0,57	-0,44	2	0,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1	1,0	-1,0	8,4
FS 2	0,15	0,39	-0,83	2	0,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1	-1,0	-1,0	8,8
OLD	0,77	0,88	0,25	2	0,0	0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1	0,5	2,0	8,3

wrate: μ ; w_: Wurzel; z_: z-Transformation; gruppe: 1=überdurchschnittlich, 2=durchschn., 3=unterdurchschn.; ten_: Tensid; an: anionisch; nich: nichtionisch; bz: Bakterizid; ethoxy: Ethoxylierungsgrad; schaum: Entschäumer; typ: 1=natürlich, 2=mineralisch; iso: Iso-Verbindungen; unges: ungesättigte Verbindungen; log_zell: \log_{10} (Plateauzell-dichte).

Danksagung

Leider ist es mir nicht mehr möglich, dem Initiator dieser Arbeit, Prof. Dr. Reimer Herrmann, dem ehemaligen Inhaber des Lehrstuhls für Hydrologie der Universität Bayreuth, persönlich zu danken. Seinem Andenken ist diese Arbeit gewidmet.

In seiner Vertretung gebührt mein tief empfundener Dank

Prof. Dr. Ruth Freitag, Prof. Dr. Stefan Peiffer und Prof. Dr. Foken.

Des Weiteren unterstützten diese Arbeit in physischer, psychischer und materieller Hinsicht:

Dr. Jörg Taube

die Technischen Angestellten des Lehrstuhls für Hydrologie, allen voran Frau Zier und das Ehepaar Jutta und Wolfgang Eckert sowie die Mitarbeiter der Universitätswerkstätten.

die während der Projektlaufzeit beschäftigten Diplomandinnen und wissenschaftlichen Hilfskräfte: Regina Zeller, Astrid Gascho, Nha-Yong Au und Cornelia Klör.

Frau Susanne Kaiser (Rauschert Verfahrenstechnik, Steinwiesen), Frau Andrea Robien (Audi AG, Ingolstadt), Herr Bernd Stedry (Henkel KGaA, Düsseldorf).

Dr. Silke Marczinek und Uwe Abramowski.

mein Ehemann Michael Lutsch und meine Familie.

die High-Tech-Offensive des Freistaats Bayern.

Für Ihre Verdienste spreche ich allen Genannten meinen herzlichsten Dank aus.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 01.09.2004
